

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

Institut für Immunologie, Direktor: Prof. Dr. S. Bauer

**Herstellung und Charakterisierung von Tetracyclin-
induzierbaren, MIF-antisense-exprimierenden
Glioma-Transfektanten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Birgit Rinn, geb. Bauschke

aus Hanau

Marburg/Lahn 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Immunologie, Direktor: Prof. Dr. S. Bauer

**Herstellung und Charakterisierung von Tetracyclin-
induzierbaren, MIF-antisense-exprimierenden
Glioma-Transfektanten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Birgit Rinn, geb. Bauschke

aus Hanau

Marburg/Lahn 2007

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am 19.04.2007**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. M. Bacher

Coreferent: Prof. Dr. H. Renz

Für meine Familie

1. Einleitung	1
1.1 MIF	1
1.1.1 Molekularbiologische Grundlagen und Vorkommen von MIF	1
1.1.2 MIF als proinflammatorisches Zytokin im Immunsystem.....	5
1.1.3 MIF als proneoplastischer Faktor in Tumorgewebe	9
1.2 Tet-On System	12
1.3 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Zellkultur	18
2.1.1 Zelllinien	18
2.1.1.1 LN18 und LN229	18
2.1.1.2 RGL3	18
2.1.2 Kulturmedien.....	19
2.1.3 Geräte zur Zellkultur	19
2.1.4 Subkultivierung bei adhärenenten Zelllinien	20
2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	20
2.1.6 Zellklonierungsmethoden.....	21
2.1.6.1 Soft-Agar	21
2.1.6.2 Verdünnungsreihe	22
2.1.6.3 Ausplattieren	22
2.2 Das Tet-On System.....	22
2.2.1 Allgemeines Prinzip des Tet-On Systems	22
2.2.2 Transfektionen.....	24
2.2.2.1 Transiente Transfektion	24
2.2.2.2 Stabile Transfektionen	25
2.2.3 Luziferase-Assay	26
2.3 Plasmide und Vektoren.....	27
2.3.1 Plasmide des Tet-On Systems	27
2.3.1.1 pTet-On	27
2.3.1.2 pTRE2 und pTRE2-Luc	27
2.3.1.3 pTK-Hyg	29
2.3.1.4 pTet-tTs und ptTs-Control	29
2.3.2 pCRII-Vektor	31
2.3.3 pcDNA3.1/myc-His A-Vektor	32

2.4 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.4.1 Amplifizierung und Isolierung von Plasmiden	34
2.4.1.1 Transformation kompetenter Zellen.....	34
2.4.1.2 Herstellung von Ampicillin-Agar-Platten	35
2.4.1.3 Bakterienkultur und Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.4.1.4 Herstellung von Glycerin-Kulturen	37
2.4.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR.....	37
2.4.2.1 cDNA-Synthese.....	38
2.4.2.2 Primer	39
2.4.2.3 Amplifizierungsreaktion zur Herstellung des Inserts.....	40
2.4.2.4 Ligation-PCR	41
2.4.2.5 Colony-PCR	41
2.4.2.6 Agarosegelelektrophorese von DNA	42
2.4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren	43
2.4.3.1 Restriktionsverdau.....	43
2.4.3.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente.....	43
2.4.3.3 Ligation	44
2.4.3.4 Elution von DNA aus Agarosegelen	44
2.4.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	44
2.4.3.6 Photometrische Messung von Nukleinsäuren	44
2.4.3.7 Sequenzierung	45
2.4.4 Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von RNA.....	46
2.4.4.1 Präparation von RNA.....	46
2.4.4.2 Northern Blot	47
2.4.4.3 Herstellung DIG-markierter Sonden	52
2.4.4.4 Ladekontrolle für Northern Blots.....	55
2.4.5 Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von Proteinen.....	56
2.4.5.1 Aufbereitung der Proteinproben.....	56
2.4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
2.4.5.3 Western Blot.....	57
2.4.5.4 Ladekontrolle für Western Blots.....	59
3. Ergebnisse	60
3.1 Anwendung des Tet-On Systems in Glioblastom-Zelllinien.....	60
3.1.1 Erste stabile Transfektion der Zelllinien mit dem Regulatorplasmid	60

3.1.2 Der Luziferase-Assay als funktioneller Test der ersten Transfektion.....	61
3.1.2.1 Screening der T-Klone der Zelllinien RGL3, LN18 und LN229.....	61
3.1.2.2 Auswirkung unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf das Tet-On System	65
3.1.3 Auswirkungen des „Silencers“ auf RGL3 T-Klone	67
3.1.4 Klonierung der Responseplasmide im Tet-On System	70
3.1.5 Zweite stabile Transfektion der T-Klone mit dem Responseplasmid.....	71
3.2 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Sondenherstellung	73
3.2.1 Klonierung von Plasmiden für die in vitro-Transkription.....	73
3.2.1.1 Klonierung einer für murinen MIF kodierenden Sequenz in den pCRII-Vektor	73
3.2.1.2 Klonierung einer für humanen MIF kodierenden Sequenz in pcDNA3.1/myc-His A-Vektoren	76
3.2.2 Herstellung von RNA-Sonden für Northern Blots.....	77
3.3 Charakterisierung der T-as-Klone mittels Northern Blot	78
3.3.1 T-as-Klone der murinen Zelllinie RGL3.....	78
3.3.2 T-as-Klone der humanen Zelllinie LN18.....	80
3.4 Einfluß der Doxycyclin-Dosis auf MIF-antisense-mRNA- und MIF-Protein-Gehalt	82
3.5 Zeitlicher Verlauf der Produktion von MIF-antisense-mRNA in der Kurzzeitkinetik.....	84
3.5.1 T-as-Klone der murinen Zelllinie RGL3.....	84
3.5.2 T-as-Klone der humanen Zelllinie LN18.....	85
3.6 Zeitlicher Verlauf des intrazellulären MIF-Protein-Spiegels in der Kurzzeitkinetik.....	87
3.7 Veränderung von huMIF-mRNA- und -Proteinspiegel in der Langzeitkinetik.....	88
3.7.1 Northern Blot	89
3.7.2 Western Blot.....	90
4. Diskussion	92
4.1 Bedeutung von MIF in Glioblastomen	92
4.2 Problematik der MIF-Blockade durch antisense-Technik im Tet-On System	94

4.2.1 Abhängigkeit der Genexpression und Induzierbarkeit vom Integrationsort und Zelltyp	94
4.2.2 Gesteigerte Basalexpression des „gene of interest“	95
4.2.3 Abnahme der Induzierbarkeit bei längerer Kultivierung der Zellen	96
4.2.4 Mögliche Mechanismen der zellulären Gegenregulation zur Aufrechterhaltung eines konstanten MIF-Proteinspiegels	96
4.3 Bedeutung für zukünftige Therapieoptionen bei Glioblastomen	98
5. Zusammenfassung.....	101
6. Literaturverzeichnis.....	103
7. Abkürzungen	124

1. Einleitung

1.1 MIF

1.1.1 Molekularbiologische Grundlagen und Vorkommen von MIF

Vor etwa 40 Jahren wurde erstmals ein von aktivierten T-Zellen produzierter nicht-dialysierbarer Faktor beschrieben, der in der Lage war, die ungerichtete Migration von Makrophagen zu inhibieren (Bloom, B. R. und Bennet, B. (1966), David, J. (1966), George, M. und Vaughan, J. H. (1962)). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde er „macrophage migration inhibitory factor“ oder kurz „MIF“ genannt. Er kann als erstes beschriebenes Zytokin angesehen werden.

Über 20 Jahre später gelang es Weiser, W. Y. et al. die humane cDNA für MIF aus einer T-Zelllinie zu klonieren. Die primäre mRNA weist eine Größe von etwa 700 Basen auf. Das humane MIF-Protein besteht aus 115 Aminosäuren mit einer molekularen Größe von 12,5 kDa (Weiser, W. Y. et al. (1989)). 1994 wurde dann auch die Gensequenz des humanen MIFs mit 3 Exonen und 2 Intronen identifiziert. In der Promotorregion befinden sich Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp-1 und CREB (cAMP-responsives Element Bindungsprotein) (Paralkar, V. und Wistow, G. (1994), Waeber, G. et al. (1998)). Das humane MIF-Gen liegt auf Chromosom 22 in Nachbarschaft zu den Genen für Matrixmetalloproteinase 11 und Glutathion S-Transferase (Budarf, M. et al. (1997)).

Die cDNA für murinen MIF konnte 1993 isoliert und für eine in vitro-Expression verwendet werden. Dabei wurde eine große strukturelle Homologie zum humanen MIF festgestellt. Sowohl Nukleotid- als auch Aminosäuresequenz stimmen zu nahezu 90 % überein (Bernhagen, J. et al. (1993)).

Nach Klonierung der Gensequenz konnten auch Ähnlichkeiten in der Promotorregion nachgewiesen werden. Neben der Sp-1- und CRE-Konsensus-Sequenz wurden jedoch noch Bindungsstellen für c-fos, Ap-2, CK-1 und NFκB identifiziert. Wie im humanen Gen finden sich auch hier 3 Exone und 2 Introne. Die Anzahl der Aminosäuren stimmt mit der des humanen Proteins überein. Im Gegensatz zum humanen MIF, der als einzelnes Gen vorliegt, handelt es sich beim murinen MIF um eine homologe Multigenfamilie mit Lokalisation auf Chromosom 10. Diese weiteren

Pseudogene werden jedoch nicht zu translatierbarer mRNA umgesetzt (Mitchell, R. et al. (1995)).

In der Sekundärstruktur besteht das MIF-Monomer aus 2 antiparallelen α -Helices und 6 β -Faltblättern (Suzuki, M. et al. (1996)). Diese Struktur ähnelt erstaunlicherweise eher denen der MHC-Moleküle als denen anderer Zytokine. Für die aktive Form des Proteins lagern sich die Monomere zu einem Homotrimer zusammen, der in der 3d-Struktur eine große Homologie zu der humanen D-Dopachrom-Tautomerase aufweist (Sun, H. W. et al. (1996), Sugimoto, H. et al. (1999)).

Eine enzymatische Aktivität des MIF-Proteins als D-Dopachrom-Tautomerase konnte 1996 in vitro nachgewiesen werden (Rosengren, E. et al. (1996)). Als physiologisches Substrat wurde dann eine zeitlang Phenylpyruvat vermutet (Rosengren, E. et al. (1997)). Dies konnte bis jetzt jedoch in vivo nicht nachgewiesen werden und gilt inzwischen als eher unwahrscheinlich. Ob nur die enzymatisch aktive Form die biologische Funktion des MIF-Proteins erfüllt und welche Substanz das eigentliche physiologische Substrat darstellt, konnte bis heute noch nicht einwandfrei geklärt werden (Bendrat, K. et al. (1997), Swope, M. D. et al. (1998)). Durch Mutationen im N-terminalen katalytischen Bereich konnte die enzymatische Funktion des MIF-Proteins aufgehoben werden (Nishihira, J. et al. (1998)), die Inhibition der Makrophagenmigration blieb jedoch bestehen (Hermanowski-Vosatka, A. et al. (1999), Kleemann, R. et al. (2000b)). Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe eines chemischen Inhibitors der D-Dopachrom-Tautomerase-Aktivität (ISO-1) allerdings eine reduzierte biologische Aktivität in vitro und in vivo nachgewiesen werden (Arndt, U. et al. (2002), Lubetsky, J. B. et al. (2002)). Kürzlich konnte dann auch am Modell der experimentell induzierten Sepsis eine verminderte immunologische MIF-Funktion durch den Tautomerase-Inhibitor ISO-1 gezeigt werden. Durch Gabe des Inhibitors kam es zu einer deutlich reduzierten Letalitätsrate, so dass ein Einsatz auch zu therapeutischen Zwecken diskutiert wird (Al-Abed, Y. et al. (2005)). Auch beim experimentell induzierten Diabetes mellitus Typ 1 in Mäusen konnte durch diesen Inhibitor die Zerstörung der β -Zellen, die auf einem durch MIF geförderten, autoimmunologischen Mechanismus beruht, deutlich verringert werden (Cvetkovic, I. et al. (2006)).

Des Weiteren konnte der eigentliche Rezeptor für MIF bis heute noch nicht eindeutig ermittelt werden. In eher biochemisch orientierten Studien über mögliche

Bindungspartner zeigte sich eine Interaktion zwischen MIF und Sarcolectin, einer Unterfraktion des Albumins. Allerdings wurden hierbei keine Untersuchungen zur biologischen Funktion unternommen, so dass eine physiologische Bedeutung zumindest fraglich bleibt (Zeng, F. Y. et al. (1993), Zschabitz, A. et al. (1999)).

Im Jahr 2000 konnte dann als intrazellulärer Bindungspartner das Jab-1-Protein (c-Jun-activating binding protein) ausgemacht werden. Hierbei bindet von den Zellen aufgenommener extrazellulärer MIF an Jab-1 und verhindert dadurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Kleemann, R. et al. (2000a)).

Der bislang vielversprechendste Kandidat für einen Zellmembranrezeptor wurde schließlich 2003 identifiziert. Es handelt sich hierbei um das CD74-Molekül, ein Typ II-Transmembranprotein, das u. a. auf Immunzellen und auf vielen Tumorzelllinien exprimiert wird. Dieses auch als MHCII-assoziierte invariante Kette bekannte Protein ist nach Bindung von MIF an die extrazelluläre Domäne in der Lage, eine Signaltransduktionskaskade in Gang zu setzen. Infolgedessen kommt es zu einer Aktivierung der ERK-MAP-Kinase und zur Steigerung der Zell-Replikation (Leng, L. et al. (2003)). Schon 1999 konnten auch Mitchell und Mitarbeiter eine Aktivierung der MAPK-Kaskade (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) durch MIF zeigen. Diese MIF-vermittelte Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg führt in der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 zu einer gesteigerten Proliferation, ist jedoch Serum- und somit vermutlich Cofaktor-abhängig (Mitchell, R. et al. (1999)). In nachfolgenden Studien konnte die Auslösung dieser Signaltransduktion durch MIF auch in verschiedenen anderen Zelltypen nachgewiesen werden (Endothelzellen: Amin, M. A. et al. (2003); Kardiomyozyten: Fukuzawa, J. et al. (2003); Monozyten: Leng, L. et al. (2003); Osteoblasten: Onodera, S. et al. (2002)).

Genauere Untersuchungen über die Aktivierung des ERK-MAPK-Signalweges durch MIF konnten zeigen, dass es nachfolgend zu einer Steigerung der Cyclin D1-Transkription kommt. Diese wiederum führt zu einer vermehrten Aktivierung der Cdk4 (Cyclin-dependend kinase) und zur Phosphorylierung des Retinoblastoma (Rb) Tumorsuppressors (Liao, H. et al. (2003)). Für die schnelle und transiente Aktivierung der Kaskade spielen außerdem das Jab-1/CSN5-Protein als intrazellulärer Bindungspartner und eine Src-Tyrosinkinase eine wichtige Rolle (Lue, H. et al. (2006)). Beide Mechanismen greifen im Endeffekt regulatorisch in die Zellzyklusprogression ein.

Als weitere intrazelluläre Signalkaskade konnte der PI3/AKT-Weg identifiziert werden. Dessen Aktivierung wurde zunächst in HMVECS (humane dermale mikrovaskuläre Endothel-Zellen) (Amin, M. A. et al. (2003)), später aber auch in unserer Arbeitsgruppe in humanen Glioblastom-Zelllinien gezeigt (Schrader, J. (2004), Dissertation). Auch hier spielen vermutlich Cofaktoren eine entscheidende Rolle.

Des Weiteren konnte die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern durch MIF nachgewiesen werden. Durch diesen intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration kam es sekundär zu einem weiteren Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Zytoplasma. Diese Signalvermittlung über einen „second messenger“ konnte bis jetzt jedoch nur in peritubulären Zellen des Hodens gefunden werden (Wennemuth, G. et al. (1999)).

Im Verlauf mehrerer Untersuchungen über das ursprüngliche „Zytokin MIF“ war zu erkennen, dass sich die Expression von MIF nicht nur auf die Zellen des Immunsystems beschränkte, sondern auch in Zellen vieler weiterer Organsysteme nachweisbar war.

Im Immunsystem konnte zunächst gezeigt werden, dass MIF auch von Makrophagen selbst hergestellt und sezerniert wird, obwohl diese lange Zeit nur als eigentliche Zielzellen des MIF galten (Calandra, T. et al. (1994)). Zwei Jahre später konnten Bacher, M. und Mitarbeiter die schon bei der Erstbeschreibung des MIF vermutete Produktion durch T-Lymphozyten auf molekularer Ebene bestätigen (Bacher, M. et al. (1996)). Des Weiteren wurde auch in Granulozyten und B-Lymphozyten eine MIF-Expression beschrieben (Lue, H. et al. (2002)). Somit gehen viele pathologische Prozesse, an denen das Immunsystem beteiligt ist (z. B. Infektionen, septischer Schock, Autoimmunerkrankungen und chronische Entzündungen), mit einer Erhöhung der endogenen MIF-Produktion einher (s. 1.1.2).

Nachdem 1993 schon die Expression von MIF in der Augenlinse nachgewiesen werden konnte (Wistow, G. J. et al. (1993)), gelang es Mitchell, R. und Mitarbeitern durch Northern Blot-Analyse, die Produktion von MIF auch in anderen Organen zu verifizieren (Mitchell, R. et al. (1995)). Dabei zeigte sich vor allem in Gehirn, Leber und Nieren eine hohe basale Expression, aber auch in Herz, Lunge, Milz, Skelettmuskel und Hoden konnten basal hohe MIF-mRNA-Spiegel nachgewiesen werden.

Im Gehirn wird vor allem in den Zellkörpern der Neurone MIF-mRNA produziert. Im Gegensatz dazu befindet sich das MIF-Protein hauptsächlich in den dendritischen Ausläufern der Zelle, was auf einen axonalen Transport schließen lässt. Dieses Expressionsmuster findet sich in nahezu allen Bereichen des ZNS. In den Gliazellen ist MIF-mRNA in deutlich geringerem Ausmaß nachzuweisen, dafür jedoch relativ homogen verteilt (Bacher, M. et al. (1998)).

Außerdem wird MIF-mRNA konstitutiv in den meisten Epithelien mit Kontakt zur Außenwelt exprimiert und das Protein in den Zellen gespeichert. Dies lässt vermuten, dass MIF eine Rolle bei der frühen Immunantwort des Körpers im Rahmen der Infektabwehr spielt (Bacher, M. et al. (1997), s. a. 1.1.2).

Auffällig ist des Weiteren, dass MIF auch in einigen hormonproduzierenden Zellen vorkommt und eine physiologische Wirkung im endokrinen System zu erfüllen scheint (ACTH-produzierende Zellen der Adenohypophyse: Bernhagen, J. et al. (1993); Leydig-Zellen: Meinhardt, A. et al. (1996); β -Zellen des Pankreas: Waeber, G. et al. (1997)).

Eine erhöhte Basalexpression von MIF ist außerdem in vielen Tumorzellen und immortalisierten Zelllinien nachweisbar (s. 1.1.3).

Das weitverbreitete Vorkommen von MIF legt die Vermutung nahe, dass es sich bei MIF nicht nur um ein „klassisches proinflammatorisches Zytokin“ mit Funktionen im Immunsystem handelt, sondern dass es darüber hinaus noch weitere physiologische Wirkungen erfüllt, die bis heute noch nicht vollständig verstanden sind. Im Folgenden sollen vor allem die Funktionen „Zytokin“ und „Wachstums- bzw. Angiogenesefaktor bei Tumoren“ näher betrachtet werden.

1.1.2 MIF als proinflammatorisches Zytokin im Immunsystem

Die Erstbeschreibung des MIF als löslicher Faktor im Kulturüberstand antigen-stimulierter T-Lymphozyten fand im Rahmen verschiedener Studien zur DTH-Reaktion (delayed-type hypersensitivity reaction) statt (Bloom, B. R. und Bennet, B. (1966), David, J. (1966), George, M. und Vaughan, J. H. (1962)). Am Beispiel der Tuberkulinreaktion konnten dann 1996 als Hauptproduzenten für MIF in den DTH-Läsionen die Monozyten/Makrophagen ausgemacht werden. Gleichzeitig wurde

gezeigt, dass es durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern zu einer deutlichen Reduktion der DTH-Reaktion mit geringerem mononukleären Zellinfiltrat und abgeschwächter Ödembildung kam (Bernhagen, J. et al. (1996)). Infolge dessen wurde dem MIF-Protein eine entzündungsverstärkende Funktion zugesprochen.

Auch bei Untersuchungen über den LPS-induzierten septischen Schock in Mäusen konnte für MIF eine deutlich proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden. Nach systemischer LPS-Gabe entleert sich intrazellulär gespeicherter MIF, was zu einem deutlich erhöhten MIF-Serumspiegel und zu einer Verstärkung der bestehenden Sepsis führt. Gleichzeitig steigt die Syntheserate von MIF-mRNA und -Protein deutlich an, um die intrazellulären Speicher wieder aufzufüllen. Dieser Effekt wurde zunächst in den Zellen der Adenohypophyse entdeckt (Bernhagen, J. et al. (1993)). In vielen anderen Körpergeweben kann dieser durch LPS induzierte Mechanismus jedoch auch nachgewiesen werden (Bacher, M. et al. (1996), Bacher, M. et al. (1997), Calandra, T. et al. (1994)). Durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern verringert sich in diesem Modell die proinflammatorische Wirkung und damit auch die Letalität (Bernhagen, J. et al. (1993), Calandra, T. et al. (2000)). Auch bei Infektionen mit grampositiven Erregern können ähnliche Effekte wie bei der durch gramnegative Bakterien verursachten Sepsis beobachtet werden (Calandra, T. et al. (1998)).

In Folge dieser Studien wurden MIF-defiziente Knock-out-Mäuse generiert und deren Reaktion auf systemische LPS-Gabe untersucht. Hier ergaben sich jedoch kontroverse Ergebnisse. Während Bozza, M. und Mitarbeiter eine verminderte Letalität im septischen Schock nachweisen konnten (Bozza, M. et al. (1999)), sah die Gruppe um Honma, N. keinen signifikanten Effekt der MIF-Defizienz im Endotoxinämie-Modell (Honma, N. et al. (2000)). Weitere Untersuchungen mit diesen Mäusen (s. u.) lassen sich jedoch eher dahingehend interpretieren, dass die MIF-Defizienz zu einer Abschwächung der Immunantwort führt, was mit den Beobachtungen von Bozza, M. und Mitarbeitern in Einklang zu bringen wäre.

Die These der proinflammatorischen Funktion von MIF wird weiterhin gestützt durch die Beobachtung, dass MIF eine aktivierende Wirkung auf die Zellen des Immunsystems aufweist.

Bacher, M. und Mitarbeiter wiesen nach, dass MIF bei der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen maßgeblich beteiligt ist. Auch die Interaktion mit B-

Lymphozyten und somit die Antikörperproduktion konnte durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern deutlich reduziert werden (Bacher, M. et al. (1996)).

Als Antwort auf proinflammatorische Stimuli, wie TNF α oder IFN γ , wurde 1994 die Freisetzung, Produktion und erneute Speicherung von MIF durch Makrophagen beschrieben (Calandra, T. et al. (1994)). Dieser von Makrophagen sezernierte MIF fördert in einem vermutlich autokrinen Mechanismus die Produktion von TNF α und Stickstoffoxiden (Bernhagen, J. et al. (1994)). Dies verstärkt die Endozytose und Abtötung aufgenommener Bakterien und spielt bei der Infektabwehr durch Makrophagen eine entscheidende Rolle (Juttner, S. et al. (1998), Onodera, S. et al. (1997)). Auch die Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten wird verstärkt, indem das MIF-Protein die Apoptoserate dieser Zellen senkt (Baumann, R. et al. (2003)).

Die entzündungsverstärkende Wirkung von MIF kann auch auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. So lässt sich ein deutlicher durch MIF verursachter Anstieg verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α , Interleukine oder IFN γ , beobachten (Bernhagen, J. et al. (1994), Calandra, T. et al. (1995), Mitchell, R. et al. (1999)). Diese vermehrte Zytokinproduktion wird über den Transkriptionsfaktor NF κ B vermittelt (Daun, J. M. et al. (2000)). Im Rahmen einer Studie zur rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass bei der gesteigerten Expression von IL-8 und IL-1 β neben NF κ B auch Tyrosinkinasen, die Proteinkinase C (PKC) und AP-1 eine Rolle spielen (Onodera, S. et al. (2004)). Auch die proinflammatorisch wirkenden Proteine MMP-13 und MIP-2 werden als Mediatoren der MIF-Funktion bei der experimentell induzierten Arthritis angesehen. Hierbei zeigen MIF-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Entzündungsaktivität (Ichiyama, H. et al. (2004)). In einer weiteren Studie ist auch die Regulation des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) durch MIF beschrieben. Dieser gilt als Rezeptor für bakterielles Endotoxin und wird auf Monozyten exprimiert. Der niedrige Spiegel an TLR4 in MIF-defizienten Mäusen könnte die molekulare Grundlage für eine erhöhte LPS-Resistenz der Knock-out-Mäuse darstellen (Roger, T. et al. (2001)). Allerdings kann MIF wohl nicht alleine für die vermehrte Expression dieser Proteine verantwortlich gemacht werden. In einer erst kürzlich erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass es nur durch die isolierte Gabe von rekombinantem MIF nicht zu einer Induktion der oben genannten Entzündungsmediatoren (mit Ausnahme von IL-8) kommt. MIF scheint hier eher

eine verstärkende Wirkung anderer proinflammatorischer Stimuli (z. B. LPS) aufzuweisen (Kudrin, A. et al. (2006)).

Scheinbar im Widerspruch zu dieser proinflammatorischen Funktion steht die Beobachtung, dass die MIF-Expression durch die entzündungshemmend wirkenden Glukokortikoide induziert werden kann (Calandra, T. et al. (1995)). Betrachtet man jedoch das gemeinsame Auftreten von MIF und ACTH in Zellen der Adenohypophyse und die Induktion der MIF-Transkription durch CRF (Corticotropin Releasing Factor) (Waeber, G. et al. (1998)), lässt sich hier ein Regulationsmechanismus zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren vermuten (Calandra, T. et al. (1997)), dessen genaue Wirkungsweise jedoch noch nicht verstanden ist.

Des Weiteren gingen mehrere Arbeitsgruppen der Frage nach, ob sich die oben beschriebene Aktivierung des Immunsystems auch in der eigentlichen Infektabwehr bei der Bekämpfung pathogener Keime widerspiegelt. So konnte dem MIF eine entscheidende Rolle bei der Abtötung intrazellulärer Bakterien zugesprochen werden, wie dies im Rahmen einer Studie mit an Salmonellen erkrankten MIF-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde (Koebernick, H. et al. (2002)). Auch scheint MIF bei der viralen Infektabwehr von großer Bedeutung zu sein. Erste Hinweise ergeben sich aus Studien zu Influenza A (Arndt, U. et al. (2002)), CMV (Bacher, M. et al. (2002a)) und Borna-Viren (Bacher, M. et al. (2002b)). Ebenso ist eine Beteiligung des MIFs bei der Bekämpfung von Parasiteninfektionen beschrieben (Juttner, S., et al. (1998), Martiney, J. A. et al. (2000), McDevitt, M. A. et al. (2006) Satoskar, A. R. et al. (2001)). Insofern kommt dem MIF bei der Abwehr mikrobieller Erreger eine wichtige Rolle zu, auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind und wohl bei den verschiedenen Infektionstypen auch unterschiedlich sein können.

Auch bei überschießenden Immunreaktionen, wie sie typischerweise im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen vorkommen, scheint MIF von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies ist insofern interessant, weil sich daraus neue Therapiemöglichkeiten im Sinne einer MIF-Blockade ergeben könnten.

So konnte bei der experimentell induzierten Glomerulonephritis in Ratten durch Einsatz eines neutralisierenden anti-MIF-Antikörpers eine deutliche Verbesserung der Nierenfunktion und eine Abnahme des Leukozyteninfiltrats beobachtet werden (Lan, H. Y. et al. (1997), Yang, N. et al. (1998)). In einer neueren Studie konnte

gezeigt werden, dass auch bei den proliferativen Formen der humanen Glomerulonephritis eine vermehrte Expression von MIF stattfindet, so dass auch hier eine MIF-Blockade therapeutisch sinnvoll sein könnte (Lan, H. Y. et al. (2000)).

Des Weiteren findet sich ein erhöhter MIF-Spiegel bei atopischer Dermatitis (Kitaichi, N. et al. (2005)), Asthma (Mizue, Y. et al. (2005), Kobayashi, M. et al. (2006)), Psoriasis (Steinhoff, M. et al. (1999)), Colitis ulcerosa (Murakami, H. et al. (2001)) und rheumatoider Arthritis (RA) bzw. juveniler RA (Leech, M. et al. (1999), Baugh, J. A. et al. (2002), Donn, R. et al. (2004)). Bei der juvenilen RA und der Psoriasis findet sich sogar ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Allelen der MIF-Promotorregion und der Schwere des Krankheitsverlaufs (Donn, R. et al. (2004), Donn, R. P. et al. (2004)). Ebenso wird eine Korrelation zwischen der Höhe des MIF-Spiegels und der Krankheitsaktivität bei verschiedenen Vaskulitisformen angenommen (Becker, H. et al. (2006)).

In wie weit aus diesen Erkenntnissen jedoch ein therapeutischer Nutzen gezogen werden kann, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

1.1.3 MIF als proneoplastischer Faktor in Tumorgewebe

Neben der wichtigen Rolle, die MIF bei der Immunantwort spielt, ist in den letzten Jahren immer mehr seine proneoplastische Wirkung auf Tumorgewebe (Mitchell, R. et al. (2000)) in den Blickpunkt gerückt. In vielen Präkanzerosen, Karzinomen und metastasierten Tumorerkrankungen sowie in den meisten untersuchten Zelllinien fällt eine deutlich gesteigerte Expression an MIF-mRNA und -Protein auf. Als Beispiele sind hier das Adenokarzinom der Prostata (Meyer-Siegler, K. et al. (1998)), das Kolonkarzinom (Legendre, H. et al. (2003)), das hepatozelluläre Karzinom (Ren, Y. et al. (2003)), das Adenokarzinom der Lunge (Kamimura, A. et al. (2000)), das Lymphom (Chesney, J. et al. (1999)), das Neuroblastom (Bin, Q. et al. (2002)), das Glioblastom (Bacher, M. et al. (2003), Munaut, C. et al. (2002)) und das Melanom (Shimizu, T. et al. (1999)) zu nennen. Die physiologische Funktion dieser vermehrten MIF-Produktion in Tumorgewebe ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Allerdings lässt sich hier kein einheitlicher Mechanismus der Wachstumsförderung

erkennen, sondern es sind mehrere Funktionen des MIFs nachweisbar, die teilweise auch zusammen auftreten.

Zunächst ist in diesem Zusammenhang die direkte proliferationsfördernde Wirkung von rekombinantem MIF zu erwähnen, die die Gruppe um Mitchell, R. an ruhenden Fibroblasten nachweisen konnte. In diesen Zellen führt außerdem die Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu einer gesteigerten MIF-Produktion, was wiederum eine Aktivierung der ERK-MAP-Kinase nach sich zieht (Mitchell, R. et al. (1999)). Durch Eingriff in die Zellzyklusprogression (s. 1.1.1) kommt es über diese Signalkaskade zu einer Steigerung der Proliferationsrate. Auch in einer Kolonkarzinom-Zelllinie konnte eine vermehrte MIF-mRNA- und -Protein-Expression nach Zugabe von TGF- β , PDGF und b-FGF nachgewiesen werden. Eine stabile Transfektion mit MIF-antisense-Oligos führt in diesen Zellen zu einer MIF-Reduktion und nachfolgender Proliferationshemmung (Takahashi, N. et al. (1998)).

Als weiterer und vermutlich wichtigster proneoplastischer Wirkmechanismus ist die Förderung der Neoangiogenese zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass MIF als Wachstumsfaktor für mikrovaskuläre endotheliale Zellen fungiert und sowohl in vitro als auch in vivo die Ausdifferenzierung zu reifen Blutgefäßen induziert (Amin, M. A. et al. (2003), Chesney, J. et al. (1999)). Durch Einsatz von anti-MIF-Antikörpern oder MIF-antisense-mRNA konnte in mehreren Studien eine Proliferationshemmung in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden, die auf die Blockierung der Neoangiogenese zurückgeführt wurde. Hierbei wirkt MIF wohl u.a. auch als Mediator der VEGF-induzierten Endothelzellproliferation (Lymphom: Chesney, J. et al. (1999); Kolonkarzinom: Ogawa, H. et al. (2000); Melanom: Shimizu, T. et al. (1999); nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom: White, E. S. et al. (2001), White, E. S. et al. (2003)). Des Weiteren konnten Bacher, M. und Mitarbeiter in humanen Glioblastomzellen eine Induktion der MIF-Expression durch die typischen Angiogenesereize Hypoxie und Hypoglykämie erreichen (Bacher, M. et al. (2003)). Auch in hepatozellulären Karzinomen reagieren die Zellen auf hypoxischen Stress mit einer gesteigerten MIF-Expression und darauf folgender vermehrter Angiogenese (Hira, E. et al. (2005)).

Ein weiterer proneoplastischer Faktor scheint die Apoptoseinhibition durch MIF zu sein. Diese konnte zunächst für nicht-entartete Zellen und Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden und ist dort zumindest teilweise auf die Inaktivierung von p53 durch MIF zurückzuführen (Fibroblasten: Hudson, J. D. et al. (1999); Makrophagen:

Mitchell, R. A. et al. (2002); Neutrophile: Baumann, R. et al. (2003)). Auch für Endothelzellen kann eine Hemmung des programmierten Zelltodes gezeigt werden, was wiederum für die tumorinduzierte Neoangiogenese von Bedeutung ist. Diese MIF-Wirkung wird über den PI3/Akt-Signalweg vermittelt (Amin, M. A. et al. (2003)). Über die gleiche Signalkaskade kann auch die Apoptose in einer humanen Glioblastomzelllinie durch MIF blockiert werden, so dass dieser Mechanismus auch für die Wachstumstendenz von maligne entartetem Gewebe von Bedeutung zu sein scheint (Schrader, J. (2004), Dissertation). Dies bestätigt sich auch in einer weiteren Studie an Kolonkarzinom-Zelllinien, in denen eine erhöhte MIF-Expression mit einer verminderten Apoptoserate einhergeht (Yao, K. et al. (2005)).

Im Gegensatz zu seiner ansonsten proinflammatorischen Funktion wirkt MIF der tumorspezifischen Immunantwort eher entgegen, was als weiterer wachstumsfördernder Mechanismus angesehen werden kann. So zeigten Repp, A. C. und Mitarbeiter eine durch MIF ausgelöste verminderte Lyse von Melanomzellen durch NK-Zellen (Repp, A. C. et al. (2000)). In einer weiteren Studie konnte nach Blockade von MIF durch einen spezifischen Antikörper die Zahl an zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die u.a. für die Lyse von Tumorzellen verantwortlich sind, deutlich erhöht werden. Dies spricht für eine regulatorische Funktion des MIF auf die CTL-Aktivität in Tumoren. Auch wurde in dem mit anti-MIF-Antikörpern behandelten Tumorgewebe eine vermehrte Anzahl apoptotischer Tumorzellen nachgewiesen (Abe, R. et al. (2001)).

Des Weiteren erhöht MIF die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber onkogenen Stoffen, so dass es zu einer Steigerung der malignen Transformation kommt. Dieser Mechanismus wird über die Inhibition des Tumorsuppressors p53 durch MIF ausgelöst (Fingerle-Rowson, G. et al. (2003), Petrenko, O. et al. (2003)). Auch in Neuroblastomzellen konnte eine Regulation von Tumorsuppressorgenen durch MIF nachgewiesen werden. MIF-supprimierte Neuroblastomzellen zeigten in dieser Studie erhöhte Spiegel verschiedener Tumorsuppressoren (z.B. EPHB6, VSNL-1, BLU) und außerdem eine verminderte Proliferationsrate in vivo und in vitro (Fan, J. et al. (2005)). Ebenso fand sich in Neuroblastom-Zellen eine gesteigerte Expression des Onkogens N-Myc, die durch erhöhte MIF-Spiegel hervorgerufen wurde (Ren, Y. et al. (2004)).

Auch eine migrationsfördernde Wirkung auf Tumorzellen wird dem MIF zugesprochen, was zu einer erhöhten Metastasierungsrate führen kann

(Hepatozelluläres Karzinom: Ren, Y. et al. (2003); Melanom: Shimizu, T. et al. (1999)). Ebenso könnte die in der Zelllinie eines Nasopharyngealkarzinoms nachgewiesene Induktion der Matrixmetalloproteinase-9 durch MIF zu einer gesteigerten Tumorinvasivität beitragen (Li, Z. et al. (2004)). An einer Kolonkarzinom-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Invasions- und Metastasierungsrate durch MIF vermutlich über eine Aktivierung des Rho-Signalweges verläuft (Sun, B. et al. (2005)).

Bei diesen unterschiedlichen Mechanismen, mit denen MIF zur Tumorprogression beitragen kann, verwundert es nicht, dass sich auch Korrelationen zwischen der Höhe der MIF-Expression und der Malignität bzw. der Prognose einer Tumorerkrankung finden (Hepatozelluläres Karzinom: Hira, E. et al. (2005); Adenokarzinom der Lunge: Kamimura, A. et al. (2000); Kolonkarzinom: Legendre, H. et al. (2003); Prostatakarzinom: Meyer-Siegler, K. L. et al. (2002); nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom: White, E. S. et al. (2003)).

Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen in Tumorgewebe könnte dem MIF in Zukunft sowohl eine Bedeutung in der Therapie im Sinne einer MIF-Blockade als auch in der klinischen und prognostischen Beurteilung einiger maligner Erkrankungen zukommen.

1.2 Tet-On System

Die durch Tetracyclin induzierbaren Genexpressionssysteme Tet-Off und Tet-On gehen auf Entwicklungen von Gossen, M. und Bujard, H. (1992) bzw. Gossen, M. und Mitarbeiter (1995) zurück. Sie erwiesen sich als sehr spezifische On/Off-Schalter der Transkription eines „gene of interest“ mit allenfalls geringer Hintergrundexpression im nicht-induzierten Zustand. Charakteristisch sind eine hohe, aber reversible Induzierbarkeit durch subtoxische Tetracyclindosen und eine gute Reproduzierbarkeit (Gossen, M. et al. (1993), Yarranton, G. T. (1992)).

Die beiden wesentlichen Regulationselemente der Tet-Systeme gehen auf einen prokaryotischen Mechanismus zurück, durch den in *E. coli* eine Resistenz gegenüber Tetracyclinen vermittelt wird (Gossen, M. und Bujard, H. (1992), Gossen, M. et al. (1995)). Hierbei bindet in Abwesenheit von Tetracyclinen das Tet Repressor Protein

(TetR) an die Tet Operator Sequenz (tetO) des Tetracyclin-Resistenz Operons auf dem Tn10 Transposon und blockiert dadurch die Transkription der nachfolgenden Gene. Werden die Bakterien nun einem Tetracyclin-haltigen Medium ausgesetzt, bindet Tetracyclin an TetR, so dass es von der tetO-Sequenz dissoziiert. Dadurch kommt es zur Transkription des Tetracyclin-Antiporter-Proteins, das in der Lage ist, einen aktiven Transport der Tetracycline durch die Zellmembran zu vermitteln (Hillen, W. und Berens, C. (1994)). Dieses Regulationssystem existiert normalerweise nicht in eukaryotischen Zellen, so dass es auch nicht zu einer Interaktion mit eukaryotischen Transkriptionsfaktoren in den Zielzellen kommt. Somit bezieht sich auch die Tetracyclin-abhängige Induzierbarkeit der Transkription selektiv auf das „gene of interest“ und unspezifische Effekte werden weitgehend ausgeschlossen (Gossen, M. et al. (1993), Gossen, M. et al. (1994)).

Für den Einsatz in eukaryotischen Zellen wurden die beiden Regulationselemente TetR und tetO spezifisch modifiziert. Das Regulatorprotein der Tet-Systeme entstand aus der Fusion der Aminosäuren 1-207 des TetR-Proteins mit der VP16 Aktivator-domäne des Herpes simplex Virus (Triezenberg, S. J. et al. (1988)). Die daraus resultierende Konformationsänderung des Hybridproteins führte dazu, dass die Transkription nun positiv und nicht mehr negativ reguliert wurde, d. h. durch Bindung an die Operator Sequenz wird die Genexpression aktiviert. Dieses Fusionsprotein wird als „tetracycline-controlled Transactivator“ (tTA) bezeichnet und im Tet-Off System eingesetzt, d. h. dass es in Abwesenheit von Tetracyclinen als Transkriptionsfaktor wirkt. Die Bindung von Tetracyclin an den tTA bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins, so dass es von der Operator-Sequenz dissoziiert und nicht mehr als Transkriptionsfaktor dienen kann. Dieser Vorgang ist jedoch reversibel (Gossen, M. und Bujard, H. (1992)).

Für das Tet-On System wurde durch Austausch von 4 Aminosäuren ein reverser tTA konzipiert, der nur in Anwesenheit von Tetracyclinen als Aktivator der Genexpression dienen kann (Gossen, M. et al. (1995), Hillen, W. und Berens, C. (1994)).

Als Bindungsstelle für diese Transaktivatoren in eukaryotischen Systemen dient ein ligierter Promotor, der als Tet-responsiver Promotor oder $P_{hCMV^{*-1}}$ bezeichnet wird. Er setzt sich zusammen aus dem „upstream“ gelegenen Tet-responsiven Element (TRE), das aus 7 tetO-Sequenzen besteht, und dem minimalen CMV-Promotor (P_{minCMV}). Diesem minimalen Promotor fehlt der starke „Enhancer“ des CMV

„immediate early“ Promotors, durch den es ansonsten zu einer unregulierten Hintergrundexpression kommen könnte. Dem Tet-responsiven Promotor nachgeschaltet wird dann das „gene of interest“ einkloniert, so dass dessen Transkription nur nach Bindung der Transaktivatorproteine an die TRE-Region möglich ist (Hillen, W. und Berens, C. (1994)).

In Abb. 1.1 sind schematisch die Wirkungsweise und die Elemente des Tet-On Systems dargestellt.

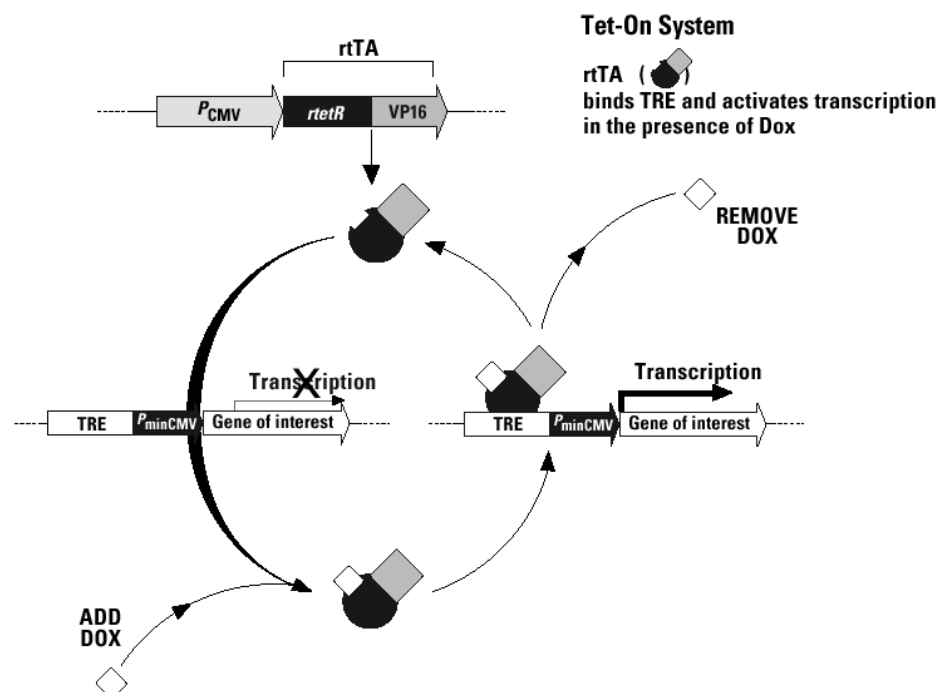


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Genregulation im Tet-On System

(aus der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

P_{CMV} : complete immediate early promotor des Cytomegalievirus

rtetR: reverse Tet repressor

VP16: Aktivatordomäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus

rtTA: reverse tetracycline-controlled Transactivator, ein Fusionsprotein aus rtetR und VP16, das in Anwesenheit von Doxycyclin spezifisch an die TRE-Region bindet und so die Transkription aktiviert

Dox: Doxycyclin

TRE: Tet-Response Element; die Regulatorsequenz auf dem pTRE2-Vektor, an die rtTA spezifisch binden kann, um die Transkription zu aktivieren

P_{minCMV} : minimal immediate early promotor des Cytomegalievirus; durch Verlust des CMV enhancers wird er nur bei Bindung des rtTA an die TRE-Region aktiv

Die beiden Regulationselemente werden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch doppelt stabile Transfektion in die Zielzellen eingebracht, so dass diese Zellen dann das „gene of interest“ unter der Kontrolle durch Tetracycline exprimieren.

Dieses Vorgehen mit zwei unabhängigen Transfektionsschritten ist dem einer Cotransfektion vorzuziehen, da ansonsten die Vektoren dazu neigen, in relativer Nachbarschaft in das Genom zu integrieren. Dies könnte wiederum dazu führen, dass das „gene of interest“ unter die Kontrolle des starken CMV-Promotors gerät, was die Gefahr einer unregulierten Basalexpression erhöht (Gossen, M. und Bujard, H. (1992)).

Sowohl die Höhe der Hintergrundexpression als auch die Regulationseigenschaften scheinen jedoch auch von anderen Faktoren beeinflusst zu werden. So können Klone einer Zelllinie häufig starke Unterschiede in der Höhe der Induzierbarkeit der Genexpression aufweisen, was einen Einfluß des genomischen Integrationsortes vermuten lässt (Baron, U. und Bujard, H. (2000)). Auch der Zelltyp scheint auf bisher noch unbekannte Weise in die Regulierbarkeit der Genexpression einzugreifen (Ackland-Berglund, C. E. und Leib, D. A. (1995), Baron, U. und Bujard, H. (2000), Howe, J. R. et al. (1995)).

Des Weiteren scheint der rtTA des Tet-On Systems eine geringe Restaffinität für die tetO-Sequenz in Abwesenheit von Tetracyclinen aufzuweisen, was das Risiko für eine gesteigerte Hintergrundexpression erhöht (Urlinger, S. et al. (2000)). Diese kann jedoch durch den Einsatz eines Tetracyclin-abhängigen „Transcriptional Silencers“ (tTS) unterbunden werden. Der tTS ist ein Fusionsprodukt aus dem TetR-Protein und der KRAB-AB Domäne des Kid-1 Proteins (Freundlieb, S. et al. (1999), Witzgall, R. et al. (1994)). In Abwesenheit von Tetracyclinen ist er in der Lage, an die tetO-Sequenz zu binden und somit die Transkription des „gene of interest“ zu blockieren. Erst durch Bindung an Tetracyclin ändert der tTS seine Konformation so, dass er die Bindungsstelle für rtTA an der TRE-Region wieder freigibt. Auf diese Weise kann die Tetracyclin-unabhängige Aktivierung der Genexpression unterbunden werden.

Zur Induktion der Genexpression können neben Tetracyclin auch einige seiner Derivate (z. B. Doxycyclin) verwendet werden (Gossen, M. et al. (1992)). In einer 1995 veröffentlichten Studie wurde zudem eine Abhängigkeit der Höhe der Genexpression von der Doxycyclin-Dosis im Zellkulturmedium nachgewiesen (Yin, D. X. und Schimke, R. T. (1995)).

Für den Einsatz im Tet-On System wird als regulierender Ligand Doxycyclin empfohlen, da es eine höhere Affinität zu rtTA aufweist als Tetracyclin (Gossen, M. und Bujard, H. (1995)). Des Weiteren verfügt Doxycyclin über eine längere Halbwertszeit von etwa 24 h und kann in geringeren Konzentrationen (10 ng/ml –1

µg/ml) eingesetzt werden, so dass es auch bei längerer Anwendung nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Durch seine gute Wasserlöslichkeit kann es außerdem problemlos dem Zellkulturmedium zugesetzt werden (Cunha, B. A. et al. (1982)).

Welches der beiden regulierbaren Genexpressionssysteme Tet-Off und Tet-On verwendet wird, hängt im Wesentlichen von deren Verwendungszweck ab. In vitro sind beide Systeme als nahezu gleichwertig anzusehen, was die Regulierbarkeit der Genexpression und die Schnelligkeit der Induktion betrifft. Allerdings empfiehlt es sich bei Genen, die meist nicht transkribiert werden sollen, auf das Tet-On System zurückzugreifen, um eine ständige Zugabe von Tetracyclinen zum Kulturmedium zu vermeiden. Dies wäre z. B. bei zytotoxisch oder apoptotisch wirkenden Genprodukten der Fall (Baron, U. und Bujard, H. (2000)). Auch um den Einfluß eines bestimmten Gens bzw. Proteins auf Zellen zu untersuchen, bietet das gezielte „Anschalten“ der Transkription deutliche Vorteile. Aus diesem Grund wurde auch für diese Arbeit dem Tet-On System der Vorzug gegeben.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in verschiedenen Glioblastom-Zelllinien ein induzierbares Genexpressionssystem zu etablieren, mit dessen Hilfe die endogene MIF-Translation in den Zellen durch ein MIF-antisense-Konstrukt reversibel inhibiert wird.

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte in vorhergehenden Studien eine erhöhte MIF-Expression in Zellen von Glioblastoma multiforme nachgewiesen werden. Das MIF-Protein findet sich hier bevorzugt in der Nähe von Blutgefäßen und in nekrotischen Tumorarealen und scheint eine Rolle als proneoplastischer Faktor in diesen hochmalignen Tumoren zu spielen (Bacher, M. et al. (2003), Munaut, C. et al. (2002), Schrader, J., Dissertation (2004)).

Um die wachstumsfördernde Wirkung von MIF auf verschiedene Tumorzellen bzw. -zelllinien näher zu untersuchen, wurden schon in diversen Arbeiten stabile Transfektionen mit MIF-antisense-Plasmiden oder antisense-Oligonukleotiden durchgeführt mit dem Ziel, die endogene MIF-Translation zu blockieren. In diesen antisense-Klonen konnte eine reduzierte MIF-Proteinexpression nachgewiesen werden, was zu einer verminderten Proliferationsrate der Tumorzellen führte. Diese

Wachstumsinhibition war zumindest teilweise auf eine verminderte Neoangiogenese zurückzuführen. Zum Teil wurde aber auch *in vitro* eine direkte Proliferationshemmung beobachtet (Glioblastom: Bacher, M. et al. (2003); Lymphom: Chesney, J. et al. (1999); Blasen-Karzinom: Meyer-Siegler, K. L. et al. (2004); Kolon-Karzinom: Sasaki, Y. et al. (2002); Melanom: Shimizu, T. et al. (1999); Kolon-Karzinom: Takahashi, N. et al. (1998); Kolon-Karzinom: Yasuda, Y. et al. (2002)). Bei Neuroblastomen konnte schließlich sogar eine verminderte Metastasierungsrate durch MIF-antisense-Konstrukte nachgewiesen werden (Ren, Y. et al. (2006)). Dies macht deutlich, dass Methoden zur Blockade der endogenen MIF-Expression in der Zukunft durchaus eine Rolle in der Therapie maligner Tumoren spielen könnten.

Ein Nachteil dieser stabil transfizierten MIF-antisense-Klone stellte sich jedoch erst nach längerer Kultivierung der Zellen heraus. So wurden in einigen MIF-antisense-Klonen anscheinend Regulationsmechanismen in Gang gesetzt, die dem reduzierten MIF-Proteinspiegel entgegen wirkten. Dies ist zum einen für Klone einer Kolon-Karzinom-Zelllinie (Takahashi, N. et al. (1998)), aber auch für murine und humane Glioblastom-Zelllinien (Ponath, G., Diplomarbeit (1999), Schrader, J., Dissertation (2004)) beschrieben und spricht wiederum für die bedeutende Funktion, die MIF in den Tumorzellen zu haben scheint.

Aus diesem Grund soll es Ziel der vorliegenden Arbeit sein, für verschiedene Glioblastomzelllinien MIF-antisense-Klone zu generieren, bei denen die antisense-Produktion unter die Kontrolle eines Tetracyclin-sensitiven Promotors gestellt wird. Mit Hilfe dieser induzierbaren MIF-antisense-Expression können dann in der anschließenden Charakterisierung der antisense-Klone die Auswirkungen der Translationsblockade auf die endogene MIF-Proteinproduktion direkt nach deren Beginn beurteilt werden, so dass den Zellen keine Möglichkeit zur Gegenregulation bleibt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. J. Schlegel (ehemals Universität Marburg, Institut für Pathologie, Abteilung Neuropathologie) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.1 LN18 und LN229

Diese beiden humanen Glioblastom-Zelllinien wurden vor über 20 Jahren in Lausanne, Schweiz, aus Operationspräparaten gewonnen und als Zelllinien etabliert. LN18 stammt von einem 65-jährigen männlichen Patienten, LN229 von einer 60 Jahre alten Frau (Ishii, N. et al. (1999), Diserens, A. C. et al. (1999)). Beide Zelllinien weisen unter anderem Mutationen im p53-Gen auf. Histopathologisch wurden beide Hirntumore als Astrozytom Grad IV (Glioblastoma multiforme) eingestuft. Die Zellen beider Linien wachsen adhärent in Kulturmedium (s. 2.1.2) mit 5 % FCS und werden etwa alle 3 Tage subkultiviert.

2.1.1.2 RGL3

Die Ratten-Gliom-Zelllinie RGL3 wurde von Schlegel, J. und Mitarbeitern (1999) etabliert und beschrieben. Dabei handelt es sich um ein transplazentar in einer BD-IX-Ratte durch Ethyl-Nitrosurea (ENU) induziertes spinale Mischgliom. Die adhärent wachsenden Zellen werden in Kulturmedium (s. 2.1.2) mit 5 % FCS gehalten und zweimal pro Woche 1:10 umgesetzt.

2.1.2 Kulturmedien

Die murine Zelllinie RGL3 sowie auch die humanen Zelllinien LN18 und LN229 werden in DMEM (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) kultiviert. Das Medium enthält bereits 1000 mg/l Glukose und 2 mM Natriumpyruvat. Zur permanenten Zellkultur werden dem Medium außerdem folgende Lösungen in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt:

- 2 mM L-Glutamin (GibcoBRL Life Technologies)
- 100 U/ml bzw. 100µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)
- 5 % Fetales Kälberserum (Biochrom), inaktiviert (30 min bei 56 °C)

Im Folgenden wird dieses supplementierte Medium als Kulturmedium bezeichnet. Unter Versuchsbedingungen im Tet-On System wird das FCS bis zum Ausschluß einer Kontamination des Kulturmediums mit Tetracyclinen durch 5 % „Tet System Approved Fetal Bovine Serum“ (Clontech, Heidelberg) ersetzt (Bezeichnung: Versuchsmedium (s. 3.1.2.2)).

2.1.3 Geräte zur Zellkultur

Die Zellen werden als offenes System in einem Auto-Zero-Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, ca. 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

Die Zellkulturarbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Box (Heraeus).

Die Zentrifugationsschritte werden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge (Hettich-Rotana/RP Rotor max. 4000 rpm, Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

Zur Zellzahlbestimmung wird eine Zählkammer nach Neubauer verwendet. Dabei werden die 4 großen äußeren Quadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt.

Die Zellzahl errechnet sich dann nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

2.1.4 Subkultivierung bei adhärenenten Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien werden Subkulturen angelegt, wenn die Zellen annähernd zu 100 % konfluent sind. Hierbei wird das alte Medium abgegossen und der Zellrasen einmal mit PBS-Dulbecco (ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen) (Biochrom) gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (GibcoBRL Life Technologies) behandelt, so dass sie sich von der Unterlage lösen. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt.

Nach Zentrifugation (5 min, 800 rpm, 4 °C) werden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Etwa 1/10 der Zellsuspension wird dann für die Subkultur verwendet und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Alle 3 Tage wird ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt.

Sämtliche zur Zellkultur verwendeten Lösungen werden vorher auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Als Kulturgefäße stehen Zellkulturflaschen (Costar, Bodenheim), Falcon Primaria Zellkulturschalen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) und Falcon Primaria Multiwells (Becton Dickinson) in unterschiedlichen Größen zur Verfügung.

2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellkulturen, die über einen längeren Zeitraum nicht benötigt werden, können in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren werden. Dadurch sinkt die Gefahr einer bakteriellen Kontamination in den Zellkulturen. Außerdem neigen immortalisierte Zelllinien dazu, sich mit fortschreitender Passagierung genetisch zu verändern, so dass sie nicht länger als notwendig in Kultur gehalten werden sollten.

Zum Einfrieren werden Zellen verwendet, die sich in der Wachstumsphase befinden, d. h. der Zellrasen sollte noch nicht vollständig konfluent sein.

Die Zellen werden wie in 2.1.4 beschrieben aus den Kulturflaschen abgelöst und zentrifugiert (in diesem Fall wird jedoch nur das Trypsin auf 37 °C erwärmt). Anschließend erfolgt die Resuspension der Zellen in Einfriermedium (eisgekühltes FCS mit 5 % DMSO). Die Zellsuspension wird in Einfrierröhrchen aus Polypropylen (Costar) in eine auf 4 °C vorgekühlte Einfrierbox (Stratagene, La Jolla, USA)

gegeben und dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 48 h gelagert. Anschließend werden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, wo sie nahezu unbegrenzt lagern können.

Zum Auftauen werden die Zellen schnell im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und sofort in 50 ml Kulturmedium gegeben, um das zytotoxische DMSO auszuwaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 800 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) werden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt. Die Zellen werden mindestens 5 Tage in Kultur gehalten, bevor sie wieder in Versuchen eingesetzt werden.

2.1.6 Zellklonierungsmethoden

2.1.6.1 Soft-Agar

In einem Soft-Agar können einzelne Zellen isoliert werden und anschließend zu Zellklonen heranwachsen. Er besteht aus einem Base-Agar und einem Top-Agar mit den eingeschlossenen Zellen. Hergestellt wird der Soft-Agar nach einem Protokoll von David Bowtell (1998).

Um den Base-Agar anzufertigen, werden 5 ml Aqua dest. mit 0,05 g Agarose (GibcoBRL Life Technologies) aufgekocht, so dass ein 1 %iges Agarosegel entsteht. Das Gel wird dann im Wasserbad langsam auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Gleichzeitig erwärmt man 5 ml 2x DMEM à la Franz Brandl (GibcoBRL Life Technologies), supplementiert mit 20 % FCS (Biochrom), ebenfalls auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Beide Lösungen werden dann gemischt und gleichmäßig in ein Falcon 6-well-plate (Becton Dickinson) gegossen (1,5 ml pro well).

Für den Top-Agar benötigt man 5 ml eines 0,7 %igen Agarosegels und ebenfalls 5 ml des o. g. Mediums. Beides wird im Wasserbad auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ equilibriert. Beim Mischen der beiden Lösungen wird außerdem eine vorbereitete Zellsuspension hinzugegeben. Dann wird der Top-Agar ebenfalls in das 6-well-plate gegossen. Die Zelldichte sollte ungefähr 500 Zellen pro well betragen, so dass die einzelnen Zellklone später einen ausreichend großen Abstand zueinander haben.

Nach ca. 4-8 Wochen im Brutschrank sind die Zellklone so gewachsen, dass man sie unter dem Mikroskop aus dem Soft-Agar isolieren und in ein Falcon Primaria 24-well-plate (Becton Dickinson) mit Kulturmedium überführen kann.

2.1.6.2 Verdünnungsreihe

In Falcon Primaria 96-well-plates (Becton Dickinson) wird eine Verdünnungsreihe einer Zellsuspension angefertigt. Im ersten well befinden sich dabei 500 Zellen, die in 11 Schritten jeweils 1:2 verdünnt werden. Wenn die Zellen wieder adhärent geworden sind (nach ca. 5 Stunden), werden unter dem Mikroskop diejenigen wells markiert, in denen sich nur eine einzelne Zelle befindet. Aus dieser wächst dann in 1-3 Wochen Kultivierung im Brutschrank ein Zellklon heran.

2.1.6.3 Ausplattieren

Glioblastom-Zelllinien haben die Eigenschaft, dass sie nicht nur als Monolayer, sondern auch übereinander wachsen. Dies macht man sich bei dieser Klonierungsmethode zu Nutzen. Es werden ca. 50 gut suspendierte Zellen auf Falcon Primaria Zellkulturschalen (60 x 15 mm) (Becton Dickinson) ausgesät, so dass die Zellen einzeln, mit großem Abstand zueinander adhärent werden können. Nach 1-3 Wochen sind die Zellklone dann so stark gewachsen, dass sie mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse in Falcon Primaria 24-well-plates (Becton Dickinson) überführt werden können.

2.2 Das Tet-On System

2.2.1 Allgemeines Prinzip des Tet-On Systems

Das Prinzip des Tet-On Gene Expression System (Clontech) besteht darin, dass das zu untersuchende Gen unter die Kontrolle eines Tetracyclin-sensitiven Regulators gestellt wird. Die Genexpression wird dabei durch Zugabe von Tetracyclinen angeschaltet. Diese Methode geht auf Arbeiten von Gossen, M. und Mitarbeitern (1995) bzw. Hillen, W. und Berens, C. (1994) zurück (schematische Darstellung s. Abb. 1.1)

Zur Anwendung dieses Prinzips werden doppelt-stabil transfizierte Zelllinien hergestellt (s. Abb. 2.1).

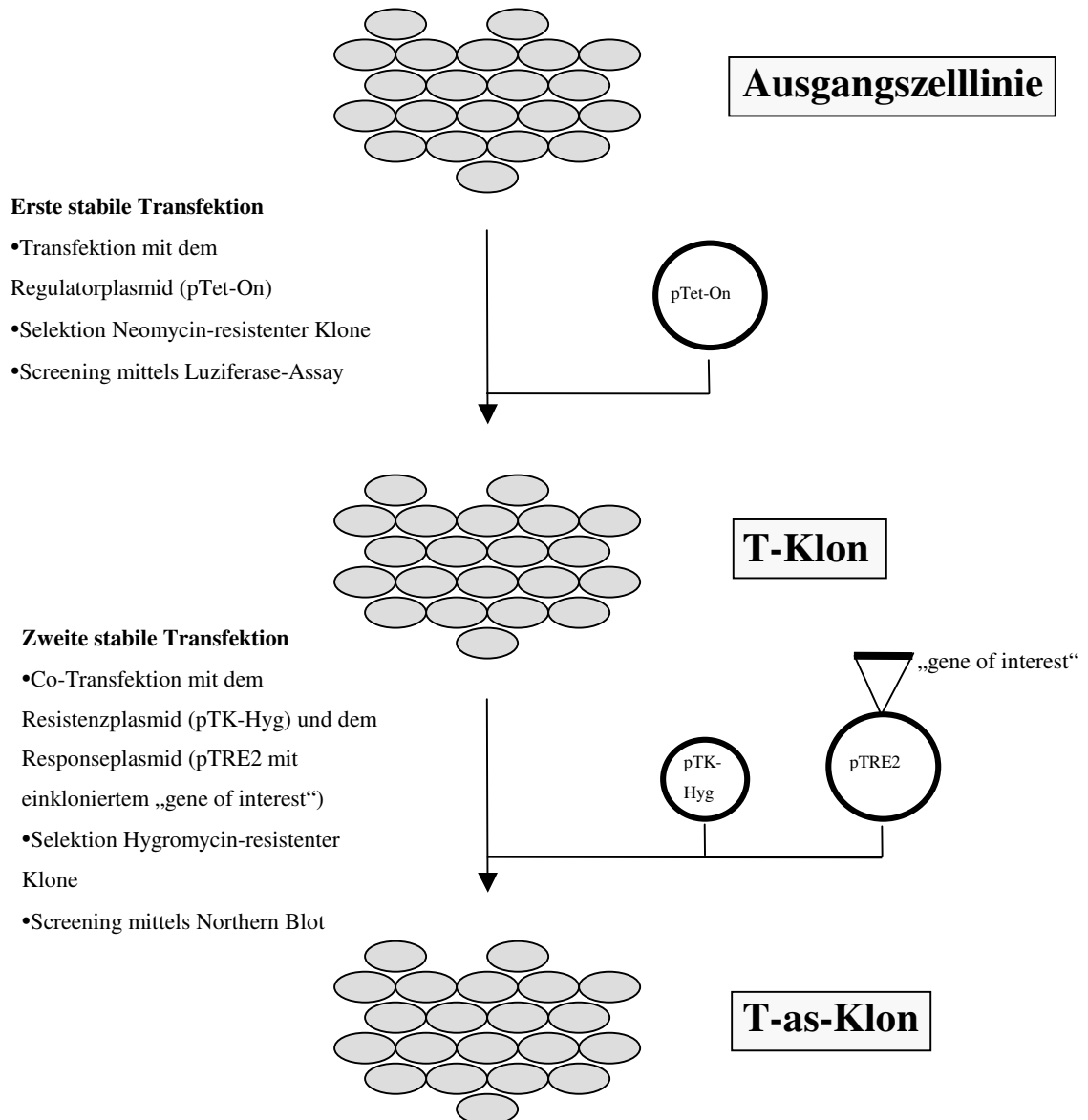


Abb. 2.1 Entwicklung einer doppelt-stabil transfizierten Tet-On Zelllinie
(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

Dabei wird in einer ersten stabilen Transfektion (s. 2.2.2.2) das Regulatorplasmid pTet-On (Clontech) in das Genom der Zellen integriert. Anschließend werden die Zellen einer Selektion mit 1000 µg Neomycin (G418-Sulfate) (Invitrogen, Groningen, Niederlande) pro ml Medium unterzogen, so dass nur Zellklone mit integriertem Regulatorplasmid überleben. Diese werden im Folgenden als T-Klone bezeichnet (s. Ergebnisse). Als funktioneller Test für die Induzierbarkeit des Tet-On Systems in den T-Klonen wird ein Luziferase-Assay (s. 2.2.3) durchgeführt. Ziel dabei ist es, diejenigen T-Klone zu identifizieren, die bei niedriger bzw. nicht

nachweisbarer Basalexpression des Luziferase-Gens eine hohe Induzierbarkeit der Genexpression durch Doxycyclin aufweisen.

Diese Zellklone werden dann für die zweite stabile Transfektion eingesetzt. Hierfür werden das Responseplasmid pTRE2 (Clontech) mit dem einklonierten „gene of interest“ und das Resistenzplasmid pTK-Hyg (Clontech) benötigt. Es erfolgt eine Cotransfektion der beiden Plasmide im Verhältnis 10:1 (2,0 µg pTRE2 : 0,2 µg pTK-Hyg). Dabei wird davon ausgegangen, dass Zellen, die das Resistenzplasmid aufnehmen und somit die Selektion überleben, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das Responseplasmid integrieren. Anschließend wird eine Selektion mit 100-200 µg Hygromycin B (Clontech) pro ml Medium durchgeführt, wodurch einzelne Klone isoliert werden. Diese werden im Folgenden als T-as-Klone bezeichnet (s. Ergebnisse). Zur Charakterisierung der Klone werden Northern Blots (s. 2.4.4.2) durchgeführt, um die Steigerung des mRNA-Spiegels des „gene of interest“ nach Doxycyclingabe zu dokumentieren.

Die so gewonnenen doppelt-stabil transfizierten Tet-On Zelllinien zeigen eine hohe Induzierbarkeit der mRNA-Synthese des gewünschten Gens nach Doxycyclingabe bei sehr geringer Hintergrundexpression.

2.2.2 Transfektionen

Unter Transfektion im allgemeinen versteht man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen auf biochemischem oder physikalischem Weg. In dieser Arbeit werden „cationic lipid reagents“ verwendet, die bewirken, dass die DNA in Liposome verpackt die Zellmembran durchdringen kann (Felgner, P. L. et al. (1987), Gareis, M. et al. (1991), Gershon, H. et al. (1993), Smith, J. G. et al. (1993)).

2.2.2.1 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen werden in dieser Arbeit benötigt, um die so behandelten Zellen im Luziferase-Assay (s. 2.2.3) einsetzen zu können.

Zur Vorbereitung der Transfektion werden pro Ansatz ca. 100.000 Zellen der mit dem Regulatorplasmid transfizierten T-Klone der Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und RGL3 in Falcon Primaria 24-well-plates (Becton Dickinson) in

Kulturmedium ausgesät und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag haben die Zellen eine Konfluenz von etwa 80-90 % erreicht.

Zur eigentlichen Transfektion wird dann der Transfektionskomplex hergestellt. Dieser besteht aus 2 µl Lipofectamine Reagent (GibcoBRL Life Technologies) und 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA in 100 µl DMEM ohne Zusätze (GibcoBRL Life Technologies). Durch Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur bilden sich die DNA-Lipid-Komplexe aus.

Währenddessen werden die Zellen nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit PBS^{-/-} (Biochrom) gewaschen und die einzelnen wells mit 300 µl purem DMEM aufgefüllt. Nach Zugabe von je 100 µl des Transfektionskomplexes zu den einzelnen Ansätzen erfolgt eine Inkubation für 5 h im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wird das Transfektionsgemisch durch 800 µl Kulturmedium ersetzt und die Zellen für 48 h in Kultur gehalten, bevor sie im Luziferase-Assay eingesetzt werden.

2.2.2.2 Stabile Transfektionen

Bei einer stabilen Transfektion werden die Zellen nach der Transfektion einem Selektionsantibiotikum ausgesetzt, so dass nur diejenigen Zellen überleben, die das Plasmid mit dem darauf vorhandenen Resistenzgen aufgenommen und in ihr eigenes Genom integriert haben. Diese selektionierten Zellen können dann zu Klonen mit neuen genetischen Eigenschaften heranwachsen.

Die Transfektion erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Pro Ansatz werden 200.000 Zellen in Falcon Primaria 6-well-plates (Becton Dickinson) ausgesät. Angepasst an die höhere Zellzahl wird der Transfektionskomplex aus 200 µl DMEM mit 5 µl Lipofectamin und 0,2-2 µg DNA hergestellt und nach der Ausbildung der DNA-Lipid-Komplexe mit je 800 µl DMEM in den einzelnen wells ergänzt. Dieses Transfektionsgemisch wird nach der fünfstündigen Inkubationszeit gegen 2 ml Kulturmedium ausgetauscht.

Nach 24 h in Kultur werden die nun konfluenten Zellkulturen 1:6 geteilt (s. 2.1.4), um den Zellen ein normales Wachstum zu ermöglichen.

Zwei Tage nach der Transfektion beginnt die Selektion durch Zugabe des Selektionsantibiotikums. In dieser Arbeit wird je nach verwendetem Plasmid (s. 2.3) Neomycin (G418-Sulfat) (Invitrogen) oder Hygromycin B (Clontech) verwendet.

Alle drei Tage erfolgt ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe des Selektionsantibiotikums.

Nach etwa 2-4 Wochen sind die resistenten Zellen soweit gewachsen, dass die Klonierung beginnen kann (s. 2.1.6).

2.2.3 Luziferase-Assay

Das Prinzip des Luziferase-Assays beruht auf der Oxidation des Leuchtkäfer-Luziferins durch das Enzym Luziferase unter Lichtemission. Es wird das Luziferase-Assay-System der Firma Promega, Mannheim, verwendet.

Der Assay dient in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Zellklone nach der ersten stabilen Transfektion mit dem Regulatorplasmid pTet-On (s. 2.2.1 und 2.3.1.1).

Dazu wird eine transiente Transfektion (s. 2.2.2.1) der T-Klone mit dem Reporterplasmid durchgeführt, das das Gen für Luziferase enthält (pTRE2-Luc (Clontech)). Durch Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium wird die Synthese des Enzyms Luziferase induziert. Nach 48 h wird das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen einmal in PBS^{-/-} (Biochrom) gewaschen. Die Zelllyse erfolgt durch Zugabe von 100 µl M-PER (Pierce, Rockford, USA) und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur unter Schütteln. Nach Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm und 4 °C) in einer Biofuge 17 RS (Heraeus) werden je 30 µl der Überstände in FluoroNunc Module (96-wells) (Nunc, Wiesbaden) überführt. Als Leerwert dienen 30 µl M-PER. Im Luminometer (Lumistar, BMG Lab Technologies, USA) werden automatisch je 100 µl Luziferin-Substratlösung (Promega) pro well zugegeben. In 20 Einzelmessungen wird die in Folge der Substratumsetzung entstehende Lumineszenz durch das Gerät bestimmt. Die Stärke der Lichtemission ist somit ein Maß für die Induzierbarkeit des Tet-On Systems in den verwendeten T-Klonen.

2.3 Plasmide und Vektoren

2.3.1 Plasmide des Tet-On Systems

2.3.1.1 pTet-On

Der pTet-On-Vektor dient als Regulatorplasmid im Tet-On System und hat eine Größe von 7370 bp. Unter dem Namen pUHD17-1neo wurde er 1995 von Gossen, M. und Mitarbeitern entwickelt und beschrieben. Er kodiert für das rtTA-Protein (reverse tet Transactivator), das in Anwesenheit von Tetracyclinen die Transkription aktiviert, indem es an die TRE-Region des Responseplasmids bindet. Die rtTA-Region setzt sich zusammen aus Sequenzen für rtetR (reverse tet repressor) und für VP16 (Aktivator-Domäne des Herpes Simplex Virus) (s. Abb. 2.2). Des Weiteren weist der pTet-On-Vektor folgende Eigenschaften auf:

- P_{CMV}-Promotor
- Ampicillin- und Neomycin-Resistenz
- SV 40 poly A-Sequenz
- Col E1 origin of replication

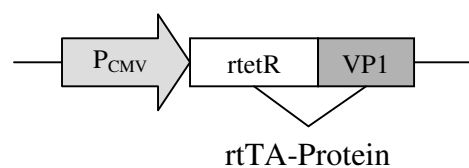


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des pTet-On-Vektors
(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)
Erläuterung der Abkürzungen im Text.

2.3.1.2 pTRE2 und pTRE2-Luc

Als Responseplasmid im Tet-On System wird der pTRE2-Vektor (Clontech) verwendet, der als pUHD10-3 erstmals 1994 beschrieben wurde (Resnitzky, D. et al. (1994)). Die Vektorkarte ist Abb. 2.3 zu entnehmen.

Als Promotor dient $P_{hCMV^{*-1}}$, der das Tet-responsive Element (TRE) und den „minimal immediate early promotor“ des CMV (P_{minCMV}) enthält. Das TRE-Element sorgt für die Induzierbarkeit der Transkription durch Tetracycline. Das Gen X („gene of interest“) wird unmittelbar nach dem Promotor in die MCS einkloniert und untersteht somit der Transkriptionskontrolle durch Tetracycline.

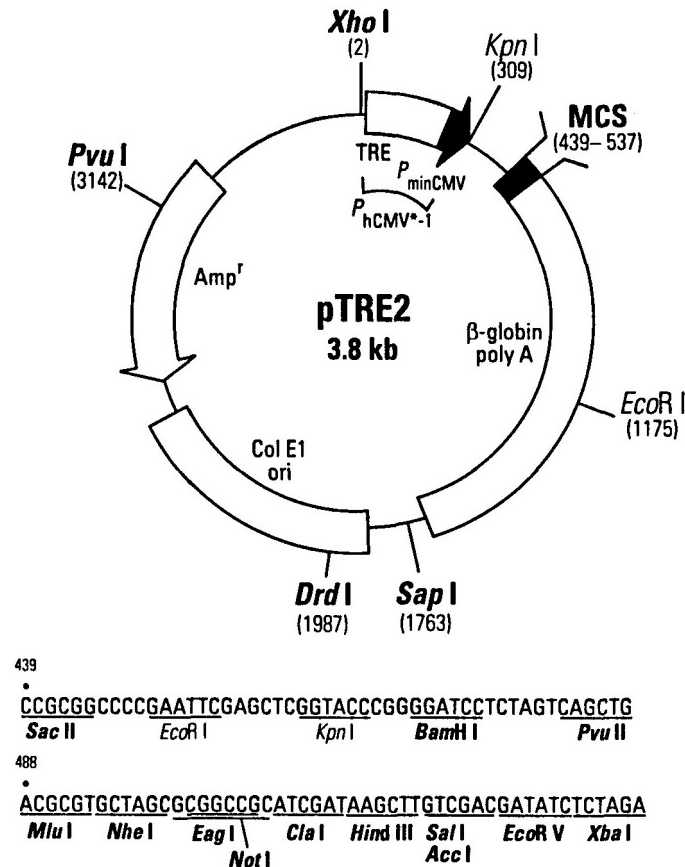


Abb. 2.3 Vektorkarte und MCS des pTRE2-Vektors
(aus der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

Der pTRE2-Luc-Vektor (Clontech) dient als Reporterplasmid im Luziferase-Assay (s. 2.2.3). Zwischen den Restriktionsstellen für BamHI und NheI in der MCS wurde das Luziferase-Gen (1649 bp) (Luc-Gen) in den pTRE2-Vektor einkloniert (s. Abb. 2.4).

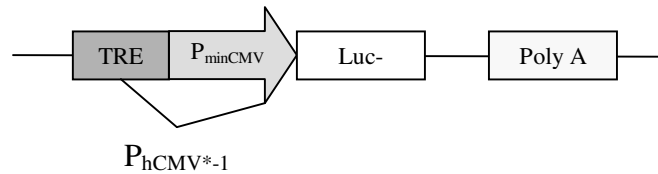


Abb. 2.4 Schematische Darstellung des pTRE2-Luc-Vektors

(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

TRE und P_{minCMV} werden zusammengefasst unter dem Begriff des P_{hCMV*-1}-Promotors.

Weitere Abkürzungserläuterungen im Text.

2.3.1.3 pTK-Hyg

Der pTK-Hyg-Vektor (Clontech) kodiert für eine Hygromycin-Resistenz (Hyg^r) (s. Abb. 2.5). Er wird zusammen mit dem pTRE2-Vektor cotransfiziert, um eine Selektion transfizierter Zellen zu ermöglichen. Seine Größe beträgt 5066 bp. Zusätzlich enthält er noch folgende Elemente:

- P_{HSV TK}-Promotor
- Ampicillin-Resistenz
- HSV TK Poly A-Sequenz
- pUC origin of replication

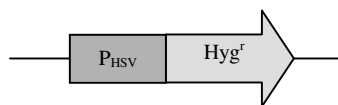


Abb. 2.5 Schematische Darstellung des pTK-Hyg-Vektors

(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

Erläuterung der Abkürzungen im Text.

2.3.1.4 pTet-tTS und ptTS-Control

Der pTet-tTS-Vektor (Clontech) wurde als pUHS 6-1 erstmals 1999 von Freundlieb, S. und Mitarbeitern beschrieben. Er wird zusammen mit dem Tet-On System eingesetzt, um eine unkontrollierte Genexpression in Abwesenheit von Tetracyclinen

zu vermeiden. Vor allem findet er bei Zellklonen Verwendung, die im Luziferase-Assay eine starke Hintergrundexpression an Luziferase aufweisen, aber eine gute Induzierbarkeit zeigen. In diesen Fällen wird der Silencer pTet-tTS zusammen mit den Vektoren pTRE2 und pTK-Hyg kotransfiziert.

pTet-tTS kodiert für das Protein „tetracycline-controlled Transcriptional Silencer“ (tTS) (s. Abb. 2.6), das in Abwesenheit von Tetracyclinen die Transkription blockiert. Dies geschieht durch Bindung des tTS an die tetO-Sequenz im Tet Response Element (TRE) (s. a. Ergebnisse). Das tTS-Protein ist ein Fusionsprotein aus dem Tet Repressor Protein (TetR) und der KRAB-AB Domäne des Kid 1-Proteins.

Der Vektor ist 4,3 kb groß und weist noch folgende Eigenschaften auf:

- P_{CMV}-Promotor
- Ampicillin-Resistenz
- SV 40 Poly A-Sequenz
- Col E1 origin of replication

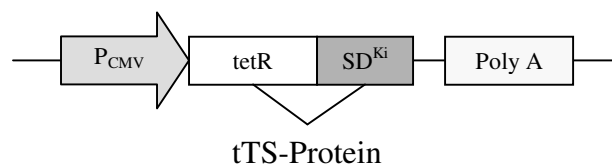


Abb. 2.6 Schematische Darstellung des pTet-tTS-Vektors
(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)
Erläuterung der Abkürzungen im Text.

Der ptTS-Control-Vektor (Clontech) kodiert für Luziferase und wird bei tTS-exprimierenden Zellklonen im Luziferase-Assay eingesetzt. Er ähnelt dem pTRE2-Luc-Vektor (s. 2.3.1.2), enthält allerdings zusätzlich noch einen starken CMV-Enhancer vor dem P_{hCMV*-1}-Promotor (s. Abb. 2.7), der für eine hohe Hintergrundexpression sorgt.

Im Luziferase-Assay kann dann überprüft werden, ob der in den Zellklonen vorhandene tTS in der Lage ist, diese Hintergrundexpression zu unterbinden.

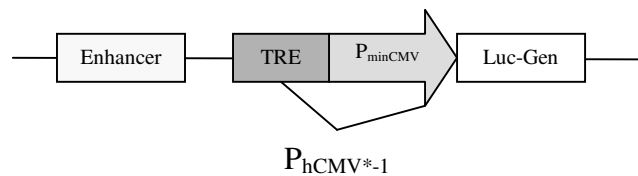


Abb. 2.7 Schematische Darstellung des pTS-Control-Vektors
(modifiziert nach der Produktbeschreibung der Firma Clontech)
Erläuterung der Abkürzungen im Text.

2.3.2 pCRII-Vektor

Der pCRII-Vektor (Invitrogen) wird in dieser Arbeit für Klonierungen zum Schreiben von Northern-Sonden verwendet. Die Vektorkarte ist Abb. 2.8 zu entnehmen.

Der Vektor enthält einen lac-Promotor mit dazugehörigem lacZ α -Fragment. Er weist außerdem eine Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz auf und einen „Col E1 origin of replication“. Als Promotoren für in vivo- oder in vitro-Transkriptionen dienen zum Schreiben der sense-RNA der Sp6-Promotor und für die antisense-RNA der T7-Promotor. Zur Sequenzierung des inklonierten Inserts können M13 Forward- und Reverse-Primer verwendet werden.

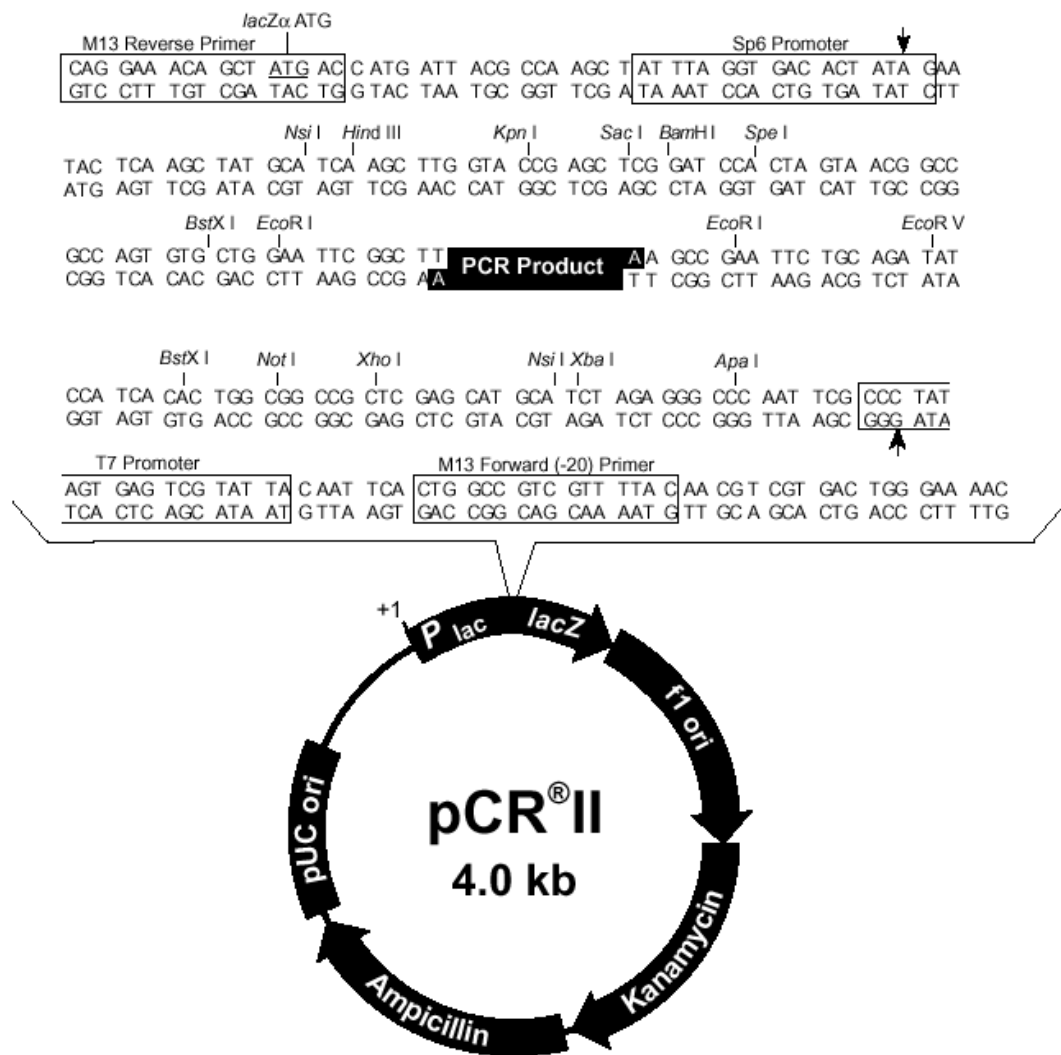


Abb. 2.8 Vektorkarte und MCS des pCRII-Vektors
(aus der Produktbeschreibung der Firma Invitrogen)

2.3.3 pcDNA3.1/myc-His A-Vektor

Der pcDNA3.1/myc-His A-Vektor (Invitrogen) ist in zwei Versionen ((-) und (+)) erhältlich, deren Multiple Cloning Sites exakt spiegelbildlich angeordnet sind. In Abb. 2.9 ist die Vektorkarte des (+)-Vektors dargestellt.

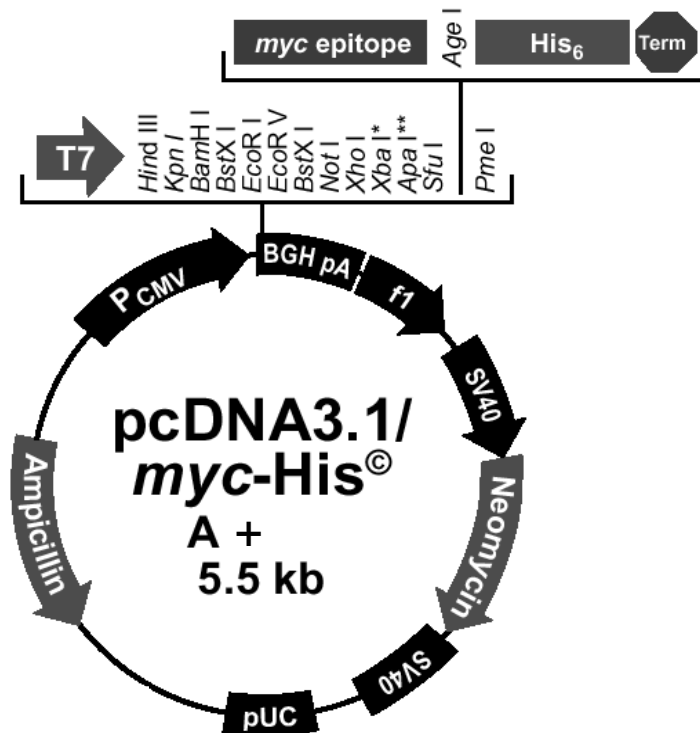


Abb. 2.9 Vektorkarte des pcDNA3.1/myc-His A(+)-Vektors
(aus der Produktbeschreibung der Firma Invitrogen)

Das in die MCS einklonierte Insert untersteht bei diesem Vektor dem CMV-Promotor. Der T7-Promotor kann für in vitro-Transkriptionen verwendet werden. Dabei wird beim (+)-Vektor sense-RNA, beim (-)-Vektor antisense-RNA gebildet. Der Vektor weist Resistenzen für Ampicillin und Neomycin auf und einen „Col E1 origin of replication“. Insgesamt beträgt die Größe des Vektors 5494 bp.

In dieser Arbeit wird der Vektor für Klonierungen mit anschließender in vitro-Transkription zur Herstellung von Northern-Sonden eingesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Amplifizierung und Isolierung von Plasmiden

2.4.1.1 Transformation kompetenter Zellen

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wird das entsprechende Plasmid in kompetente *E. coli* transformiert. Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen werden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Verwendung fanden folgende Bakterienstämme :

- MAX Efficiency DH 5 α competent cells (GibcoBRL Life Technologies)
- OneShot TOP 10 (Invitrogen)
- JM 109 competent cells (Promega)

Die Zellen lagern bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dürfen während der gesamten Transformationsdauer nicht über $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt werden. Aus diesem Grund erfolgen alle Arbeitsschritte auf Eis.

DH 5 α

Pro Transformationsansatz werden $50\text{ }\mu\text{l}$ der DH 5 α -Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 50-500 ng Plasmid-DNA werden die Zellen vorsichtig gemischt und für 40 min auf Eis inkubiert. Die nun folgende Hitzeschockbehandlung (45 sec im $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad) macht die Zellwand kurzzeitig für die Plasmide durchlässig und ist somit der entscheidende Schritt für die Transformation. Nach weiteren 3 min Inkubation auf Eis werden $150\text{ }\mu\text{l}$ S.O.C-Medium (GibcoBRL Life Technologies) zu dem Transformationsansatz gegeben. Es folgt eine Regenerationsphase für die Bakterienkultur auf dem Schüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 225 rpm für 1 h.

Anschließend werden $100\text{ }\mu\text{l}$ der Kultur auf vorgewärmte Ampicillin-Agar-Platten (s. 2.4.1.2) ausgestrichen und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank für 16 h inkubiert.

OneShot Top 10

Jeweils 50 µl der kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Um die Zellwand für die Plasmide durchlässiger zu machen, gibt man 2 µl 2-β-Mercapto-Ethanol (Merck, Darmstadt) hinzu. Anschließend werden 50-200 ng Plasmid-DNA mit den Zellen vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgt die Hitzeschockbehandlung (30 sec bei 42 °C im Wasserbad) und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Schließlich werden 200 µl S.O.C-Medium (GibcoBRL Life Technologies) zugegeben. Nach einer Regenerationszeit von einer Stunde bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler werden 100 µl der Bakterienkultur auf vorgewärmte Ampicillin-Agar-Platten (s. 2.4.1.2) ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

JM 109

Zur Transformation werden je 100 µl der JM 109-Zellen verwendet, die mit ca. 50 ng Plasmid-DNA (gelöst in einem Volumen von maximal 10 µl) gemischt werden. Die Ansätze inkubieren anschließend für 20 min auf Eis. Dann erfolgt der Hitzeschock für 50 sec bei 42 °C und ein weiterer Inkubationsschritt für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl kaltem S.O.C-Medium und Regenerierung für 75 min bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler werden 300 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Die transformierten Bakterien können dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank zu Kolonien heranwachsen.

2.4.1.2 Herstellung von Ampicillin-Agar-Platten

Für ca. 20 Platten werden 400 ml LB-Medium (GibcoBRL Life Technologies) mit 6 g Select-Agarose (GibcoBRL Life Technologies) in der Mikrowelle aufgekocht. Vor der Zugabe von 50 ng/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen) muss das Medium im Wasserbad auf 55 °C abkühlen. Anschließend wird der Ampicillin-Agar unter sterilen Bedingungen in Zellkulturschalen (100 x 20 mm) (Becton Dickinson) gegossen.

2.4.1.3 Bakterienkultur und Isolierung von Plasmid-DNA

Da sich auf den verwendeten Plasmiden ein Resistenzgen für Ampicillin befindet, wachsen nur die Zellen, die das Plasmid auch aufgenommen haben, auf den Ampicillin-Agar-Platten zu Kolonien heran. Diese Kolonien können mit Hilfe einer ausgeglühten Metallöse in flüssiges LB-Medium (GibcoBRL Life Technologies) mit 50 ng/ml Ampicillin (Sigma) überimpft werden. Nachdem die Kulturen für 12-14 h bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler gewachsen sind, kann die Plasmid-DNA aus ihnen isoliert werden.

Das Volumen der angesetzten Kulturen hängt von deren weiteren Verwendungszweck ab.

Analytische Plasmid-Isolierung

Die analytische Plasmid-Isolierung wird vor allem nach Transformation von Ligationsansätzen (s. 2.4.3.3) durchgeführt, um sicher zu gehen, dass das amplifizierte Plasmid auch wirklich das einklonierte Fragment enthält. Hierbei werden 5-10 Kolonien gepickt und in jeweils 4 ml LB-Ampicillin-Medium kultiviert. Die DNA-Isolierung aus je 2 ml Bakterienkultur erfolgt mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die so gewonnene Plasmid-DNA wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut (s. 2.4.3.1) und anschließend auf einem 1 %igen Agarosegel (s. 2.4.2.6) elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des entstehenden Bandenmusters kann festgestellt werden, ob die Bakterien das richtige Plasmid mit dem einklonierten Fragment aufgenommen haben. Eine dieser so untersuchten Bakterienkulturen kann dann für eine präparative Plasmid-Isolierung eingesetzt werden.

Präparative Plasmid-Isolierung

Bei einer präparativen Plasmid-Isolierung sollen größere Mengen an Plasmid-DNA (300-700 µg) gewonnen werden. Hierfür werden 200 ml LB-Ampicillin-Medium mit 200 µl einer Flüssig-Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die DNA-Isolierung erfolgt dann mit dem QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.4.1.4 Herstellung von Glycerin-Kulturen

Transformierte Bakterienkulturen können als Glycerin-Kulturen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Sie dienen zu einem späteren Zeitpunkt als Ausgangsmaterial für eine präparative Plasmid-Isolierung (s. 2.4.1.3). Es werden 10 ml Bakterienkultur in LB-Ampicillin-Medium (s. 2.4.1.3) für 6 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert, so dass sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Anschließend werden die Kulturen bei 3000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge J2-21, Beckmann, Frankfurt). Das entstandene Zellpellet wird in 5 ml Glycerin-Medium (LB-Medium (GibcoBRL Life Technologies) mit 30% Glycerin (Merck)) resuspendiert und in Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Köln) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.4.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis, K. B. et al. (1986)). Sie beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen zu können, wenn ihnen ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA zur Verfügung steht.

Hierzu wird ein DNA-Gemisch durch Erhitzen denaturiert und mit einem Überschuß an Primern inkubiert. Als Primer dienen zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide, die die zu amplifizierende Sequenz begrenzen. Durch die Hybridisierung von Primern und Einzelstrang-DNA entstehen kurze doppelsträngige Bereiche, an denen die Polymerisation beginnen kann. Es wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* verwendet. Diese Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, ist aber auch für kurze Zeit bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil.

Als Leerwert dienen alle unter 2.4.2.3 angegebenen Reagenzien ohne den Zusatz von DNA. Zur Kontrolle der PCR wird immer ein Parallelansatz mit den Primern für GAPDH (s. 2.4.2.2) mitgeführt.

Prinzipiell läuft jede PCR nach folgendem Schema ab:

- Vollständige Denaturierung der DNA-Matrize für 5 min bei 95 °C
- Mehrfache Wiederholung des Reaktionszyklus von Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation
- Vervollständigung der Amplifikate für 5 min bei 72 °C

Bei der zyklischen Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation wird genau die DNA-Sequenz vervielfacht, die zwischen den beiden Primern liegt, so dass es zu einer exponentiell ansteigenden, selektiven Vermehrung dieser Sequenz im Verlauf der PCR kommt.

Die Temperatur für die Anlagerung der Primer richtet sich nach ihrer jeweiligen Schmelztemperatur, die nach folgender Formel berechnet werden kann:

$$T_M (^\circ\text{C}) = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 600 / N + 16,6 \times \log M$$

(Sambrook, J. et al., 1989)

- N: Anzahl der bindenden Nukleotide des Oligonukleotids
- log M: dekadischer Logarithmus der Na^+ - und K^+ -Molarität

Generell kann man sagen, dass sich die Spezifität der Primeranlagerung mit steigender Temperatur erhöht.

Die Dauer des Polymerisationsschrittes richtet sich nach der Länge des zu erwartenden Fragments und kann mit etwa einer Minute für 1000 bp kalkuliert werden.

2.4.2.1 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird das Enzym Reverse Transkriptase (RT) verwendet, das RNA in DNA umschreibt. Als Startpunkt für die reverse Transkription dienen Oligo-dT.

Als Matrize wird 1 µg RNA in 11 µl Aqua dest. aufgenommen und 10 min bei 72 °C erhitzt. Dadurch werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA gelöst und die nachfolgende Anlagerung von Oligo-dT an die Poly-A-Region erleichtert. Anschließend wird die Probe sofort auf Eis gelagert und mit folgenden Lösungen versehen:

- 4,0 µl 5x RT-Puffer (GibcoBRL Life Technologies)
- 2,0 µl DTT (0,1 M) (Gibco BRL Life Technologies)
- 1,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (Promega)
- 1,0 µl Oligo-dT 18 (MWG-Biotech, Ebersberg)
- 0,8 µl Aqua dest.
- 0,2 µl Superscript II RT (GibcoBRL Life Technologies)

Die cDNA-Synthese erfolgt durch Inkubation der Probe für 1 h bei 42 °C. Anschließend wird das Enzym bei 95 °C (10 min) inaktiviert.

2.4.2.2 Primer

Humaner MIF	sense	5'-GCTAAGCTTGCCATCATGCCGATGTTCATC-3'
	antisense	5'-GCTGGATCCCTCTTAGGCGAAGGTGGAGT-3'
Muriner MIF	sense	5'-GCTAAGCTTGCCACCATGCCTATGTTCATC-3'
	antisense	5'-GCTGGATCCGACTCAAGCGAAGGTGGAAC-3'
GAPDH	sense	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3'
	antisense	5'-GCTATACCAGGAAATGAGCTT-3'

Die DNA-Sequenzen der Gene stammen aus folgenden Veröffentlichungen:

- Humaner MIF: Paralkar, V., Wistow, G. (1994)
- Muriner MIF: Mitchell, R. et al. (1995)
- GAPDH: Datenbank der „European Molecular Biology Organization“ (EMBO, Heidelberg)

Die Primer werden von MWG-Biotech GmbH synthetisiert. In dieser Arbeit werden sie zur Herstellung eines Inserts (s. 2.4.2.3) für nachfolgende Ligationen verwendet. Außerdem werden sie für Colony-PCRs (s. 2.4.2.5) benötigt, die als Kontrollreaktion für Transformationen dienen.

pTRE2	sense	5'-CGCCTGGAGACGCCATCC-3'
	antisense	5'-CCACACCTCCCCCTGAAC-3'
pCRII	Sp6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'
	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Diese Oligonukleotide hybridisieren mit den dazu gehörigen Vektoren beiderseits der Multiple Cloning Site (MCS). Die pTRE2-Primer stammen von Clontech, die T7- und Sp6-Promotor-Primer für den pCRII-Vektor sind von Invitrogen zu beziehen. Sie werden in dieser Arbeit zur Kontrolle von Ligation und Transformation in Ligation- (s. 2.4.2.4) und Colony-PCRs (s. 2.4.2.5) eingesetzt.

2.4.2.3 Amplifizierungsreaktion zur Herstellung des Inserts

Die PCR wird in 500 µl Safe-Lock Tubes (Eppendorf) durchgeführt. Zu 1 µl der DNA-Matrize (humane oder murine cDNA (s. 2.4.2.1)) werden folgende Lösungen zugesetzt, so dass ein Endvolumen von 50 µl entsteht:

- 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
- 0,25 µl AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer)
- 1,6 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (Promega)
- 1,0 µl sense-Primer (20 pmol/µl)
- 1,0 µl antisense-Primer (20 pmol/µl)
- 40,15 µl Aqua dest.

Die Amplifizierungsreaktion für GAPDH, humanen und murinen MIF erfolgt in einem Touch Down Hybrid Thermocycler nach folgendem Schema, wobei der Reaktionszyklus 30 mal wiederholt wird:

- Denaturierung: 1 min bei 95 °C
- Reaktionszyklus: 30 sec bei 95 °C (Denaturierung)
30 sec bei 60 °C (Hybridisierung)
30 sec bei 72 °C (Polymerisation)
- Polymerisation: 5 min bei 72 °C

2.4.2.4 Ligation-PCR

In der Ligation-PCR wird als DNA-Matrize 1 µl eines aufgereinigten Ligationsansatzes (s. 2.4.3.3) verwendet. Sie dient dazu, vor einer Transformation festzustellen, ob zwischen Vektor und Insert eine Ligation stattgefunden hat. Die verwendeten Primer (pTRE2- und pCRII-Primer, s. 2.4.2.2) hybridisieren mit dem Vektor beiderseits der Multiple Cloning Site, so dass bei erfolgter Ligation ein PCR-Produkt etwa in Größe des einklonierten Inserts entsteht. Reaktionslösungen und Puffer werden wie in 2.4.2.3 eingesetzt und nach folgendem Schema im Thermocycler inkubiert:

Vektor	Denaturierung	Hybridisierung	Polymerisation	Zyklen
pCRII	1 min 95 °C 30 sec 95 °C	30 sec 55 °C	30 sec 72 °C 5 min 72 °C	30
pTRE2	30 sec 94 °C 30 sec 94 °C	1 min 63 °C	2 min 68 °C 7 min 68 °C	30

2.4.2.5 Colony-PCR

Mittels Colony-PCR können nach einer Transformation (s. 2.4.1.1) diejenigen Kolonien ermittelt werden, die tatsächlich das gewünschte Plasmid aus einer Ligationsreaktion (s. 2.4.3.3) aufgenommen haben. Dazu wird ein Teil einer Bakterienkolonie lysiert und deren DNA als Matrize für eine PCR eingesetzt. Ein anderer Teil der Kolonie wird aufbewahrt als Ausgangsmaterial für eine evtl. nachfolgende Plasmidpräparation.

Zur Lyse wird die Bakterienkolonie in 20 µl Aqua dest. suspendiert und dann für 5 min auf 99 °C erhitzt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 12000 rpm in einer Biofuge 17 RS (Heraeus) werden 10 µl des Überstandes abpipettiert und für die PCR verwendet. An weiteren Reagenzien werden benötigt:

- 31,8 µl Aqua dest.
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (Promega)
- 1 µl sense-Primer (20 pmol/µl)
- 1 µl antisense-Primer (20 pmol/µl)
- 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer (Perkin-Elmer)
- 0,25 µl AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer)

Als Primer werden die o. g. für humanen und murinen MIF verwendet, mit denen die Amplifizierungsreaktion wie unter 2.4.2.3 beschrieben erfolgt. Alternativ werden die pTRE2 und pCRII-Primer nach dem in 2.4.2.4 gezeigten Schema eingesetzt.

2.4.2.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, geschnittene Plasmid-DNA, o. ä.) nach ihrer molekularen Größe wird ein 1 %iges Agarose-Gel verwendet.

Dazu wird die entsprechende Menge an Agarose (Electrophoresis Grade) (GibcoBRL Life Technologies) in 1x TAE-Puffer aufgeköcht und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten werden je nach Größe der Geltaschen 10-30 µl Probe versetzt mit 6x DNA-Ladepuffer aufgetragen. Als Größenstandard dienen 2 µl 100 bp-Marker (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Als Laufpuffer wird 1x TAE verwendet. Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wird eine Spannung von 4-8 V/cm Gellänge angelegt.

Nach Inkubation des Gels in Ethidiumbromidlösung für 20 min können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Fotografieren der Gele erfolgt mit einem computergestützten Aufnahmesystem (Vilber Lourmat, Fröbel Labortechnik, Wasserburg).

1x TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat 0,001 M EDTA 1,1 ml Eisessig ad 1000 ml Aqua dest.	Merck Roth, Karlsruhe Merck
6x DNA-Ladepuffer	30 % (w/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol Aqua dest.	Serva, Heidelberg Sigma Sigma
Ethidiumbromidlösung	50 µl Ethidiumbromid (0,2 %) ad 100 ml Aqua dest.	Merck

2.4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

2.4.3.1 Restriktionsverdau

Bei Verdaureaktionen macht man sich die Fähigkeit von Endonukleasen zu nutze, DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden zu können.

Zur präparativen Restriktion werden 3-10 µg Plasmid-DNA eingesetzt (z. B. Linearisierung des Vektors vor Ligationen). Analytische Restriktionen werden mit 0,2-1 µg Plasmid-DNA durchgeführt (z.B. zur Kontrolle von Plasmid-DNA nach Transformationen (s. 2.4.1.3). Außerdem werden Endonukleasen zum Verdau von PCR-Fragmenten zur Herstellung überstehender Enden vor Ligationen verwendet. Die Verdaureaktionen werden mit Endonukleasen und entsprechenden Pufferlösungen der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt. Pro µg DNA im Reaktionsansatz werden 2 U Enzym verwendet. Der Verdau erfolgt durch Inkubation der Proben für 2 h bei 37 °C. Vor der weiteren Verwendung der DNA-Fragmente erfolgt eine Aufreinigung der Probe (s. 2.4.3.4 und 2.4.3.5).

2.4.3.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu vermeiden, wird die 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe der alkalischen Shrimp-Phosphatase (Boehringer,

Mannheim) und des entsprechenden Puffers entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.4.3.3 Ligation

Die Ligation linearisierter Vektor-DNA mit dem entsprechenden Insert erfolgt mit Hilfe von T4-DNA-Ligasen, welche unter ATP-Verbrauch 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verbinden. Es werden Enzyme mit den dazu gehörigen ATP-haltigen Puffern der Firmen Novagen, Schwalbach, und Promega entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Vektor- und Insert-DNA werden im Verhältnis 1:3 (100 ng : 300 ng) eingesetzt. Die Ligationsansätze inkubieren bei 16 °C für 12-18 h.

2.4.3.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung können definierte DNA-Fragmente aus dem Agarosegel eluiert werden. Dazu wird die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit zur Aufreinigung linearisierter Plasmide nach vorangegangener Restriktionsverdau (s. 2.4.3.1) angewendet.

2.4.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten (z. B. nach PCR oder Restriktionsverdau von PCR-Produkten) wird das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden die Enzyme, Primer und Puffer der vorangegangenen Reaktionen entfernt und die DNA schließlich in Aqua dest. aufgenommen.

2.4.3.6 Photometrische Messung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration in wässriger Lösung wird in einer Quarzküvette gegen einen Leerwert von Aqua dest. photometrisch bestimmt. Dabei wird in einem Gilford Response IITM UV-Vis Spectrometer die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gemessen. Aus der Messung bei 260 nm lässt sich die Konzentration der

Nukleinsäuren berechnen, während die optische Dichte bei 280 nm Auskunft über die Proteinkonzentration in der Probe gibt. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ zeigt die Reinheit der Nukleinsäureprobe an. Er sollte zwischen 1,5 und 2 liegen, da bei niedrigeren Werten die Verunreinigung durch Proteine zu hoch ist.

Einer OD₂₆₀ von 1 entsprechen näherungsweise Konzentrationen für doppelsträngige DNA von 50 µg/ml und für RNA von 40 µg/ml (Sambrook, J. et al. (1989))

Die Nukleinsäurekonzentrationen lassen sich dann nach folgenden Formeln berechnen:

- RNA (µg/ml) = OD₂₆₀ x 40 (molarer Extinktionskoeffizient von RNA) x Verdünnungsfaktor
- DNA (µg/ml) = OD₂₈₀ x 50 (molarer Extinktionskoeffizient von DNA) x Verdünnungsfaktor

2.4.3.7 Sequenzierung

Nach der Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor wird durch eine Sequenzierreaktion die Sequenz des Inserts auf seine Richtigkeit hin überprüft.

Einige Sequenzierungen werden von der Firma MWG-Biotech durchgeführt, andere mit Hilfe des ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Diese Sequenzierreaktion beruht auf der Kettenabbruchmethode (Sanger, F. et al. (1977)) mit Didesoxynukleotiden. Die verschiedenen Didesoxynukleotide sind hierbei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass eine Analyse der Probe in nur einer Gelspur erfolgen kann.

Für die Sequenzierreaktion werden 1 µg DNA, 10 pmol Sequenzierprimer (z. B. pTRE2-sense-Primer (s. 2.4.2.2) bei Klonierung eines Inserts in den pTRE2-Vektor) und 4 µl des mitgelieferten Reaktionsmixes gemischt und mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsmix enthält die fluoreszenzmarkierten Nukleotide, den Reaktionspuffer und die Polymerase. Im Thermocycler (Touch Down Hybrid Thermocycler) findet dann die Reaktion in 25 Zyklen statt:

- Denaturierung: 30 sec bei 96 °C
- Hybridisierung: 15 sec bei 50 °C
- Polymerisation: 4 min bei 60 °C

Anschließend wird die Probe mit 80 µl Aqua dest. aufgefüllt. Durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) (Merck) und 250 µl Ethanol (96 %) (Riedel-de-Haen, Seelze) wird die DNA gefällt. Nach 25 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C (Biofuge 17 RS, Heraeus) wird der Überstand entfernt. Anschließend wird das DNA-Pellet mit 300 µl Ethanol (70 %) (Riedel-de-Haen) gewaschen und dann getrocknet. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wird die DNA in 2 µl Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Sequenzierproben werden mit einem ABI PRISM™ 377 Sequencer (Applied Biosystems) aufgetrennt. Die Aufnahme der Rohdaten erfolgt mittels eines Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission anregt. Die Lichtimpulse werden mit einer Kamera aufgenommen und zur Auswertung digitalisiert. Mit dem Computerprogramm ABI PRISM™ 377 Data Collection Program (Applied Biosystems) können die Sequenzierdaten errechnet und ausgedruckt werden.

Sequenzierprobenpuffer	80 % (v/v) Formamid 1 % (v/v) Dextranblau 5 mM EDTA Aqua dest.	ICN, Meckenheim Applied Biosystems Applied Biosystems
------------------------	---	---

2.4.4 Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von RNA

2.4.4.1 Präparation von RNA

Zur Isolierung von RNA aus Zelllysaten werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden angewandt. Grundsätzlich wird bei den Arbeiten mit RNA auf RNase-Freiheit aller verwendeten Materialien geachtet.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA aus Zelllysaten wird Trizol-Reagenz (GibcoBRL Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen werden je nach Größe der Zellkulturschale mit 0,3-1,0 ml Trizol-Reagenz

lysiert. Das darin enthaltene Phenol zerstört Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen, so dass die Protein-Nukleinsäure-Komplexe aufbrechen. Mit Hilfe von Gummischabern werden die Zellen aus den Kulturschalen abgelöst und in 1,5 ml Safe-Lock Tubes (Eppendorf) überführt. Das zugegebene Chloroform denaturiert die Proteine und erleichtert die Phasentrennung, so dass die obere wässrige Phase mit der darin gelösten RNA leicht isoliert werden kann. Nach Fällung der RNA und mehreren Reinigungsschritten wird das RNA-Pellet getrocknet und in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. Durch Inkubation der Probe für 10 min bei 55 °C wird die RNA gelöst. Anschließend kann sie bei –80 °C gelagert werden. Die Bestimmung der RNA-Konzentration in der Probe erfolgt wie unter 2.4.3.6 beschrieben. Zusätzlich können mit der Trizol-Methode aus den Zelllysaten auch Proteine und DNA gewonnen werden. Da dieser Vorteil der Phenol-Chloroform-Extraktion in dieser Arbeit jedoch nicht zur Anwendung kommt, wird im weiteren Verlauf meistens die effizientere Methode der RNA-Extraktion über eine Säulenaufreinigung (s. u.) verwendet.

Aufreinigung über Säulen

Alternativ zur Trizol-Methode kann die RNA auch mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll isoliert werden. Die RNA wird schließlich mit 50 µl Aqua dest. eluiert und bei –80 °C gelagert. Zur Messung der RNA-Konzentration s. 2.4.3.6.

2.4.4.2 Northern Blot

Elektrophoretisch aufgetrennte RNA kann mit Hilfe der Northern Blot-Technik auf eine Nylonmembran transferiert werden. Anschließend erfolgt eine Hybridisierung mit DIG-markierten Northern-RNA-Sonden, so dass einzelne RNA-Fragmente spezifisch detektiert werden können.

Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Bei der Gelelektrophorese wird die RNA in einzelne Fragmente aufgetrennt, die ihrer Größe nach geordnet sind. Nach einer Methode von Lehrbach, H. et al. (1977),

Golberg, D. A. (1980) und Seed, B. (1992) werden denaturierende formaldehyd-haltige Agarosegele benutzt.

Verwendet wird eine horizontale Gelkammer, die vor der Benutzung für mindestens 1 h in 3 %igem H_2O_2 desinfiziert und anschließend mit Aqua dest. gespült wurde. Zur Herstellung des Gels wird 1 g Agarose (Electrophoresis Grade) (GibcoBRL Life Technologies) in 95 ml 1x MOPS-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf 65 °C werden 5 ml 37 %iges Formaldehyd (Merck) zugegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen.

Die Proben werden auf einen einheitlichen RNA-Gehalt eingestellt (je nach Menge der lysierten Zellen zwischen 2 und 5 µg) und auf 15 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µl Probenpuffer wird die RNA für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Gelkammer wird zunächst nur bis zum Rand des Gels mit 1x MOPS als Laufpuffer gefüllt. Nach Auftragen von je 20 µl Probe pro Spur wird die Elektrophorese mit hoher Spannung (180 V) gestartet, damit die Proben ins Gel einlaufen können. Anschließend wird das Gel mit Laufpuffer überspült und die Elektrophorese bei 90 V für ca. 1,5 h fortgesetzt.

Zur Entfernung des Formaldehyds wird das Gel nach der Elektrophorese viermal für 5 min in Aqua dest. gewaschen.

10x MOPS-Puffer	200 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA	ICN Merck Roth
Probenpuffer	750 µl Formamid (deionisiert) 150 µl 10x MOPS-Puffer 240 µl Formaldehyd (37 %) 180 µl Aqua dest. 100 µl Glycerin 80 µl Bromphenolblau (1 %)	ICN Merck Serva Sigma
Laufpuffer	1x MOPS-Puffer	

Blotting

Beim Northern Blot werden RNA-Fragmente vertikal von einem Gel auf eine Membran übertragen. Aufgrund von Kapillarkräften wandern die RNA-Moleküle bei der Kapillar-Transfer-Methode aus dem Gel heraus und lagern sich auf der Membran ab (Thomas, P. S. (1980), Wahl, G. M. et al. (1987)). Die relativen Positionen der RNA-Fragmente bleiben dabei erhalten.

Bei dem hier verwendeten System des Turboblotters der Firma Schleicher und Schuell, Dassel, wirkt sich auf die Effizienz des Blots vor allem auch die Tatsache aus, dass die RNA in Richtung der Schwerkraft (Downward Transfer) auf die Membran übertragen wird. Der Aufbau des Blot-Systems wird in Abb. 2.10 verdeutlicht. Es wird das Turboblotter GB-Set (150 mm x 200 mm) (Schleicher und Schuell) verwendet.

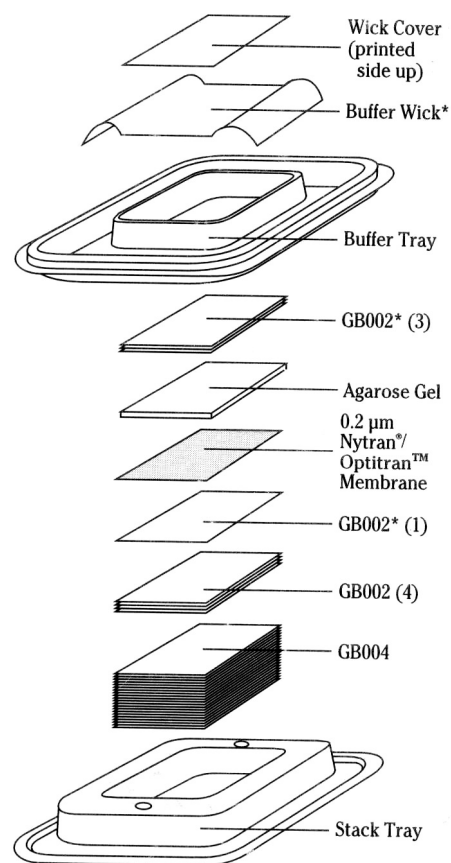


Abb. 2.10 Turboblotter

(aus der Produktbeschreibung der Firma Schleicher und Schuell)

Das gewässerte Gel und eine doppelt positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) in Gelgröße werden in dem Transferpuffer für 10 min equilibriert. Als Transferpuffer

dient 10x SSC (pH 7). Beim Aufbau des Blot-Systems muss darauf geachtet werden, dass zwischen Gel und Membran keine Luftblasen eingeschlossen sind, da dies den Transfer behindern würde.

Der Transfer erfolgt 4 h lang bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran luftgetrocknet und mit UV-Licht (254 nm, 1,25 J/cm²) bestrahlt (Fluo-Link, Biometra, Göttingen). Dadurch entsteht eine feste Verbindung der negativen Gruppen der RNA mit den positiv geladenen Aminogruppen der Membran (Crosslinking) (Church, G. M. et al. (1984)).

20x SSC (pH 7)	350,6 g NaCl	Roth
	176,4 g tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 2000 ml Aqua dest.	Roth
Transferpuffer	10x SSC	

Hybridisierung mit RNA-Sonden

Unter Hybridisierung versteht man beim Northern Blot die Anlagerung einer spezifischen Sonde an die auf der Membran gebundene RNA, so dass durch Basenpaarung doppelsträngige Nukleinsäuren entstehen. In dieser Arbeit werden DIG-markierte RNA-Sonden (s. 2.4.4.3) verwendet, so dass RNA-RNA-Hybride entstehen. Diese sind stabiler als RNA-DNA-Hybride (Bodkin, D. K. und Knudson, D. L. (1985)), so dass die Hybridisierung bei höheren Temperaturen stattfinden kann und somit die Spezifität der Bindung erhöht wird.

Die Membran mit der gebundenen RNA wird für 5 min in 2x SSC equilibriert und in eine Hybridisierungsflasche (Biometra) gegeben. Sowohl die Prähybridisierung als auch die Hybridisierung und die anschließenden Waschschrte erfolgen in einem Hybridisierungssofen (Hybaid, Biometra) bei 68 °C unter ständiger Rotation.

Um unspezifische Bindungsstellen für die RNA-Sonde weitgehend zu blockieren, wird die Membran für 2 h in Hybridisierungslösung inkubiert (Prähybridisierung). Anschließend wird die entsprechende Sonde in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben und die Membran über Nacht hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt unter stringenten Bedingungen, um eine fehlerhafte Basenpaarung zu vermeiden (Wahl, G. M. et al. (1987)).

Am nächsten Tag wird die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer I und zweimal 15 min in Waschpuffer II gewaschen.

2x SSC	s. o. 20x SSC	
Hybridisierungslösung	5x SSC mit 50 % (v/v) Formamid 2 % (w/v) Blockierungsreagenz 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin 0,02 % (w/v) SDS 100 µg/ml denaturierte Salm-DNA	ICN Boehringer Sigma Serva Sigma
Waschpuffer I	2x SSC mit 0,1 % SDS	Serva
Waschpuffer II	0,1x SSC mit 0,1 % SDS	Serva

Detektion der hybridisierten RNA

Die hybridisierte Membran wird für 5 min in 1x Maleinsäurepuffer equilibriert und anschließend 60 min in 2 %igem Blockierungspuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wird ein an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter anti-DIG-Antikörper im Verhältnis 1:1500 zugegeben und die Membran für weitere 30 min geschwenkt. Das anti-DIG-AP-Konjugat bindet an die DIG-markierte RNA-Sonde und kann schließlich durch Zugabe eines Chemolumineszenzsubstrates sichtbar gemacht werden. Hierfür wird die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer geschwenkt und 5 min in Reaktionspuffer equilibriert. Als Chemolumineszenzsubstrat wird CDP-Star (Tropix, Boehringer, Ingelheim) verwendet, mit dem die Membran dann für 5 min vollständig bedeckt wird. Nach Einschweißen der feuchten Membran in eine Folie erfolgt eine Inkubation für 15 min bei 37 °C. Dabei wird das Substrat durch die alkalische Phosphatase umgesetzt und zerfällt nach der Dephosphorylierung unter Lichtemission. Diese kann dann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden (Holtke, H. J. et al. (1992), Dubitsky, A. et al. (1992), Vaillancourt, R. E. et al. (1992)). Die Intensität der Lichtemission ist direkt proportional zur auf der Membran gebundenen spezifischen RNA-Menge. Es werden Röntgenfilme der Firma Kodak,

Stuttgart (Biomax MR I) und Fotochemikalien (Entwickler G152, Fixierer G354) der Agfa-Gaefert AG, Leverkusen, verwendet.

10x Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	23,21 g Maleinsäure 17,53 g NaCl 16,06 g NaOH ad 2000 ml Aqua dest.	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn Roth Merck
Blockierungspuffer (10 %)	1x Maleinsäurepuffer mit 10 % Blockierungs- reagenz	Boehringer
Waschpuffer (pH 7,5)	1x Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20	Serva
Reaktionspuffer (pH 9,5)	5,84 g NaCl 2 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,83 g Tris-HCl 11,58 g Tris-Base ad 1000 ml Aqua dest.	Roth Merck Serva ICN
anti-DIG-AP-Konjugat	Polyklonale Schaf-anti- DIG-Fab-Fragmente konjugiert an alkalische Phosphatase (750 U/ml)	Boehringer

2.4.4.3 Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Verwendung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden stellt eine Alternative zu den häufig gebrauchten radioaktiv-markierten Sonden dar (Kessler, C. (1990), Holtke, H. J. et al. (1990), Seibl, R. et al. (1990), Muhlegger, K. et al. (1990), Martin, R. et al. (1990)). Sie werden durch in vitro-Transkription klonierter DNA mit Sp6/T7-RNA-Polymerasen hergestellt. Dabei wird DIG-UTP in das Transkript eingebaut. Das Prinzip der DIG-Markierung ist in Abb. 2.11 dargestellt. In dieser Arbeit wird das DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7) der Firma Boehringer nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Das Plasmid wird mit einem Restriktionsenzym (RE) hinter dem inklonierten Insert geschnitten, damit die RNA-Polymerase nicht das gesamte Plasmid transkribiert, sondern nur den gewünschten Abschnitt. Durch diese Methode entstehen bei der Transkription „run-off“-Transkripte von definierter Länge und Nukleotidsequenz. Bei der Restriktion werden 5 µg Plasmid-DNA mit 10 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer (Boehringer) für 2 h bei 37 °C inkubiert (s. 2.4.3.1). Um den Reaktionsansatz von Proteinen zu befreien, wird dann eine Inkubation mit Proteinase K (Boehringer) (Endkonzentration 50 µg/ml) und entsprechendem Puffer für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend werden die Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 µl Aqua dest. eluiert. Durch Elektrophorese eines Teils der Probe in einem 1 %igen Agarosegel (s. 2.4.2.6) wird die Vollständigkeit der Linearisierung überprüft.

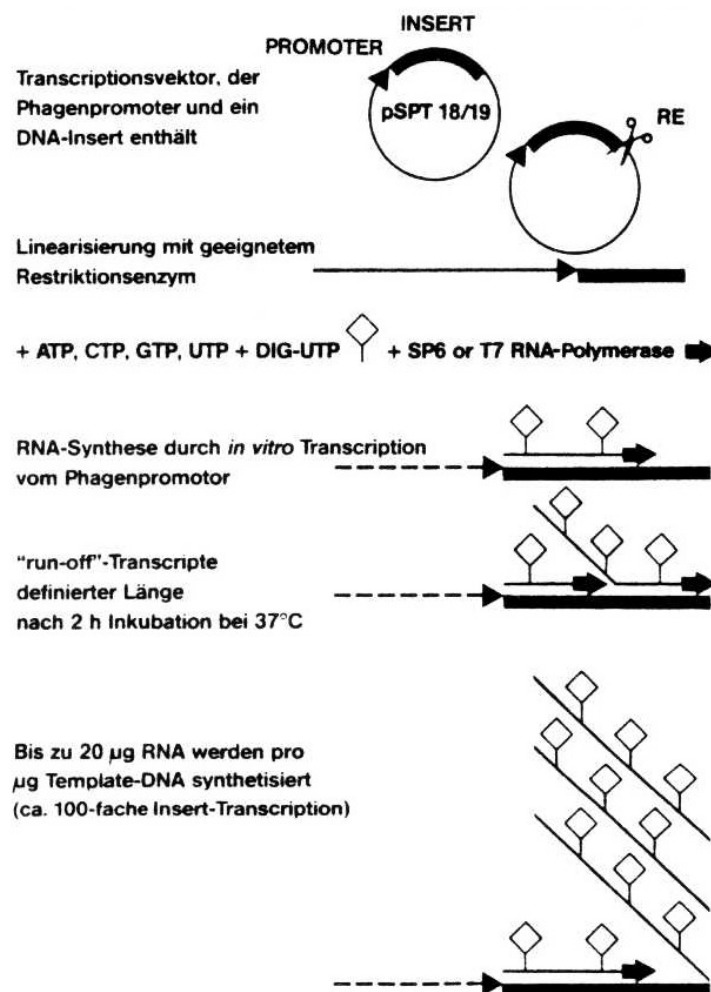


Abb. 2.11 Prinzip der DIG-RNA-Markierung
(aus der Produktbeschreibung der Firma Boehringer)

Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration in der Probe (s. 2.4.3.6), wird 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA in der in vitro-Transkription eingesetzt. Dafür werden zu der Probe folgende Reagenzien gegeben:

- 2 µl NTP Markierungsmix (10x)
- 2 µl Transkriptionspuffer (10x)
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA-Polymerase (Sp6 oder T7)

Mit Aqua dest. wird der Reaktionsansatz auf 20 µl aufgefüllt und dann für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die verbliebene DNA-Matrize durch Zugabe von 2 µl DNase I und Inkubation für 15 min bei 37 °C abgebaut. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) (Roth) gestoppt. Es folgt die Fällung der entstandenen markierten RNA-Transkripte durch Zugabe des doppelten Volumens an Ethanol (96 %) (Riedel-de-Haen) und 10 % Natriumacetat (pH 4,2) (Merck). Anschließend werden die Proben bei –80 °C für mindestens zwei Stunden gelagert.

Die RNA-Transkripte werden dann für 30 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet in Ethanol (70 %) (Riedel-de-Haen) gewaschen. Nach dem Trocknen wird die RNA in Formamid (ICN) und Aqua dest. (Verhältnis 1:1) aufgenommen. Nach Messung der RNA-Konzentration im Photometer (s. 2.4.3.6) können die Sonden bei –80 °C gelagert werden.

Zur Bestimmung des Markierungsgrades der Sonden wird ein Dot Blot angefertigt. Dazu werden unterschiedliche Konzentrationen der markierten RNA in einer Verdünnungsreihe auf eine doppelt-positiv geladene Nylonmembran (Boehringer) aufgetropft und anschließend per Chemolumineszenz (s. 2.4.4.2 (Detektion der hybridisierten RNA)) sichtbar gemacht. Anhand des Dot Blots lässt sich erkennen, ob die DIG-Markierung der Sonden ausreichend ist. Für einen Einsatz im Northern Blot sollte zumindest noch bei 1 ng aufgetropfter DIG-RNA-Sonde ein Signal erkennbar sein. Abb. 2.12 zeigt beispielhaft einen Dot Blot der sense- bzw. antisense-Sonde für murinen MIF. In beiden Fällen lassen sich auch noch 0,1 pg aufgetropfte DIG-markierte RNA mit dem entsprechenden Antikörper (s. o.) detektieren.

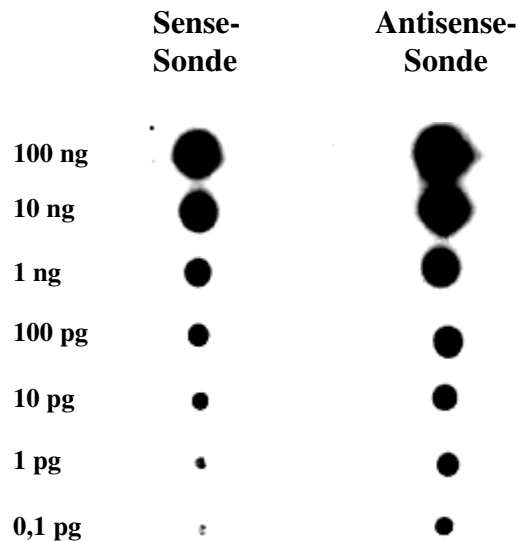


Abb. 2.12 Dot Blot DIG-markierter muMIF-RNA-Sonden (sense- und antisense-Sonde)

2.4.4.4 Ladekontrolle für Northern Blots

Zur Überprüfung, dass beim Northern Blot in den einzelnen Geltaschen jeweils die gleiche Menge an RNA vorhanden ist, muss immer eine Ladekontrolle durchgeführt werden. Damit kann verhindert werden, dass Unterschiede in den einzelnen Proben nur durch eine ungenaue RNA-Einstellung zustande kommen. Als Ladekontrolle kommen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung.

Färbung mit Methylenblau

Für die Färbung mit Methylenblau wird ein zweites Elektrophoresegel benötigt, auf dem nochmals die gleichen Proben aufgetragen werden. Dieses Gel wird dann auf eine Nitrocellulosemembran Optitran BA-S83 (Schleicher und Schuell) geblottet. Nach dem Trocknen wird die Membran 15 min in 5 %iger Essigsäure (Sigma) geschwenkt und anschließend für 5 min in Methylenblau-Lösung gefärbt. Unter fließendem Wasser wird die überschüssige Färbelösung entfernt. Die sichtbaren Banden repräsentieren die ribosomale RNA (28S-, 15S- und 5S-rRNA). Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die doppelte Menge an RNA benötigt wird, so dass in dieser Arbeit meist das Verfahren der Co-Hybridisierung (s. u.) angewendet wird.

Methylenblau-Lösung	0,5 M Natriumacetat	Merck
	0,04 % Methylenblau	Sigma

Co-Hybridisierung mit einer GAPDH-Sonde

Als sogenanntes „housekeeping gene“ wird GAPDH konstitutiv in den Zellen exprimiert, so dass der mRNA-Spiegel von GAPDH unter Versuchsbedingungen annähernd konstant bleibt. Somit kann eine Ladekontrolle durch Hybridisierung der geblotteten RNA mit einer GAPDH-antisense-Sonde erfolgen. Da die mRNAs für GAPDH (~1,4 kb) und MIF (~0,6 kb) sehr unterschiedlich groß sind, kann eine Co-Hybridisierung mit beiden Sonden auf einer Membran erfolgen, so dass keine zusätzliche RNA für eine zweite Membran benötigt wird. Die für diese Methode benötigte DIG-markierte GAPDH-antisense-Sonde wurde mir freundlicherweise von Claudia Pauligk, ehemals Universität Marburg, Institut für Immunologie, zur Verfügung gestellt.

2.4.5 Methoden zur Aufreinigung und Charakterisierung von Proteinen

2.4.5.1 Aufbereitung der Proteinproben

Zur Isolierung der intrazellulären Proteine wird das Kulturmedium vorsichtig von den Zellen entfernt und die Zellen einmal in PBS^{-/-} gewaschen. Die Zelllyse erfolgt durch Zugabe von 100-500 µl M-PER (Pierce) je nach Größe der Kulturschalen und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur unter Schütteln. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (5 min bei 13000 rpm und 4 °C) in einer Biofuge 17 RS (Heraeus), um die Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstände können dann zur weiteren Analyse eingesetzt werden.

2.4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung von Proteinkonzentrationen wird das BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die verwendeten Proteinproben werden

hierfür 1:10 verdünnt. Als Standard dient BSA (Pierce) verdünnt in M-PER (Pierce). Nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion entsteht nach Zugabe der im Kit enthaltenen Reaktionslösungen zu den Proteinproben ein violetteres Produkt, das eine hohe Absorption bei 570 nm aufweist. Durch eine photometrische Messung bei 570 nm kann so die Proteinkonzentration im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe des Albuminstandards bestimmt werden. Hierzu wird ein Mikroplatten-Photometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf) mit geräteinternem Auswertungsprogramm (Advanced Programm, Version 3.1) verwendet.

2.4.5.3 Western Blot

Der Western Blot dient in dieser Arbeit zur Darstellung des intrazellulären Gehalts an humanem MIF-Protein.

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wird das NuPAGE Electrophoresis System (Novex, Frankfurt) mit den dazu gehörigen Puffern verwendet.

Die Proteinproben werden so eingestellt, dass einheitliche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen werden können (zwischen 3 und 15 µg Gesamtprotein pro Spur je nach Menge der lysierten Zellen). Die Proben werden mit 4x Probenpuffer (Novex) und 10x Reducing Agent (Novex) versetzt und für 10 min auf 70 °C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS denaturiert bei Erwärmung die Proteine und neutralisiert ihre Eigenladung, so dass die elektrophoretische Auftrennung nur nach der Proteingröße und nicht nach der Ladung oder der Tertiärstruktur des Proteins erfolgt. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel umgekehrt proportional zu ihrer molekularen Masse.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird mit Bis-Tris-Gradientengelen (4-12 %ige Bis-Tris-Gele (Novex)) durchgeführt, die eine gute Auflösung sowohl für kleine als auch für große Proteine ermöglichen.

Der Gellauf erfolgt in Novex-Gelkammern mit 1x MES-SDS-Laufpuffer (Novex) bei konstant 200 V in 35 min. Als Standard werden 5 µl rekombinantes MIF (50 ng/ml) eingesetzt.

Blotting

Der Transfer der Proteine auf eine Optitran BA-S83 Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) erfolgt in Blot-Modulen der Firma Novex nach Angaben des Herstellers. Die relative Position der aufgetrennten Proteine bleibt dabei erhalten.

Der Transferpuffer besteht aus:

- 600 ml Aqua dest.
- 160 ml Methanol (Riedel-de-Haen)
- 40 ml NuPAGE Transfer Buffer (20x) (Novex)
- 1 ml Antioxidans (Novex)

Das Blotting auf die Membran erfolgt bei 18 V für eine Stunde. Anschließend werden durch Trocknen der Membran die Proteine fest gebunden.

Antikörperinkubation

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran mit den gebundenen Proteinen über Nacht bei 4 °C in 1x Roti-Block (Roth) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min unter Schwenken in Waschpuffer erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran viermal für 5 min in Waschpuffer gewaschen. Es folgt für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Zweitantikörper und wiederum viermaliges Waschen für je 5 min.

Erstantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-huMIF-Antikörper 1:6000 verdünnt in 1x Roti-Block (Roth)
Zweitantikörper	Goat-anti-rabbit-IgG konjugiert mit Horseradish-Peroxidase (Pierce) 1:250000 verdünnt in 1x Roti-Block (Roth)

Waschpuffer	1x PBS mit 0,05 % Tween 20	Serva
PBS (10x)	2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck Merck Roth Merck

Detektion der gebundenen Antikörper

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wird das SuperSignal ULTRA Chemoluminescent Substrate (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Substrat Luminol wird durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt und zur Lichtemission angeregt. Nach Inkubation der Membran für 5 min in der Substratlösung wird die feuchte Membran in Plastik eingeschweißt und einem Röntgenfilm Biomax MR I (Kodak) exponiert. Zur Entwicklung des Films werden Fotochemikalien (Entwickler G 152, Fixierer G 354) der Agfa-Gaefert AG benutzt.

2.4.5.4 Ladekontrolle für Western Blots

Um sicher zu stellen, dass auf allen Spuren die gleiche Menge an Gesamtprotein vorhanden ist, wird die Membran vor der Inkubation in Blockierungspuffer mit Ponceau S-Lösung (Serva) gefärbt. Dazu wird die Membran 2 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt, wodurch sich die Protein-Banden unspezifisch anfärben. Anschließend wird die überschüssige Färbelösung mit Aqua dest. entfernt und die Membran fotografiert. Der Färbeporgang ist reversibel und stört die spätere Antikörperbindung nicht.

Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau S in 3 % TCA	Serva
------------------	----------------------------	-------

3. Ergebnisse

3.1 Anwendung des Tet-On Systems in Glioblastom-Zelllinien

Das Tet-On System dient in dieser Arbeit dazu, die Produktion von antisense-mRNA des murinen bzw. humanen MIF unter die Kontrolle eines Tetracyclin-sensitiven Promotors zu stellen. Auf diese Weise soll die Wirkung der MIF-antisense-mRNA auf die endogene MIF-Expression untersucht werden.

3.1.1 Erste stabile Transfektion der Zelllinien mit dem Regulatorplasmid

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl murine (RGL3) als auch humane (LN18 und LN229) Glioblastom-Zelllinien für die Etablierung des Tet-On Systems eingesetzt. Dabei wurden die Zellen wie unter 2.2.2.2 beschrieben mit 2 µg des pTet-On Plasmids transfiziert. Die anschließende Selektion transfizierter Zellen erfolgte mit 1000 µg/ml Neomycin im Kulturmedium.

Um die passende Konzentration des Selektionsantibiotikums zu ermitteln, wurde zuvor eine Resistenztestung der Wildtypzellen der einzelnen Zelllinien durchgeführt. Dabei wurde dem Kulturmedium für eine Woche Neomycin in den Konzentrationen 500, 750 und 1000 µg/ml zugesetzt und das Wachstum der Zellen beobachtet. Die Zellen der Linien RGL3 und LN229 wuchsen bei den beiden niedrigeren Konzentrationen unbeeinflusst, bei 1000 µg/ml Neomycin im Kulturmedium kam es jedoch innerhalb von 3 Tagen zum Absterben der Zellen. Bei den LN18-Zellen konnte schon bei 750 µg/ml ein deutlich schlechteres Wachstum beobachtet werden, dennoch überlebten viele Zellen 7 Tage unter Neomycingabe, so dass auch hier zur Selektion 1000 µg/ml eingesetzt wurden.

Nach 4 Wochen wurden die Zellen dann so ausgesät, dass sie zu einzelnen Klonen heranwachsen konnten (s. 2.1.6). Dabei war auffällig, dass sich hier die einzelnen Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten unterschieden.

Zur Klonierung der RGL3-Zellen war am besten der Soft-Agar geeignet. Beim Ausplattieren zeigte sich das Problem, dass die Zellen erst relativ spät in Schichten

übereinander wuchsen und sie sich somit schlecht überimpfen ließen. Die Methode der Verdünnungsreihe konnte gar nicht verwendet werden, da sich zu stark vereinzelte RGL3-Zellen vermutlich aufgrund des Fehlens endogener Wachstumsfaktoren in ausreichender Konzentration nicht mehr teilten.

Die LN18-Zellen konnten problemlos mit allen drei Methoden kloniert werden, wobei sich die Methode des Ausplattierens als die effizienteste erwies.

Bei den LN229-Zellen war nur das Ausplattieren und Überimpfen der Klone erfolgreich, während die Zellen im Soft-Agar und in der Verdünnungsreihe kein Wachstum zeigten.

Auf diese Weise wurden für jede Zelllinie 30 Klone isoliert und einem „Screening“ im Luziferase-Assay unterzogen (s. 2.2.3).

Die einzelnen mit dem pTet-On Plasmid transfizierten Klone wurden mit der Bezeichnung „T“ und einer fortlaufenden Nummer versehen (z. B. LN18 T5).

3.1.2 Der Luziferase-Assay als funktioneller Test der ersten Transfektion

3.1.2.1 Screening der T-Klone der Zelllinien RGL3, LN18 und LN229

Der Luziferase-Assay dient zur Charakterisierung der einzelnen Zellklone nach der ersten stabilen Transfektion mit dem pTet-On Plasmid. Mit dieser Methode sollen diejenigen T-Klone gefunden werden, die nach Doxycyclingabe eine hohe Expression des Luziferase-Gens aufwiesen, während die Basalexpression (ohne Doxycyclingabe) gering bzw. nicht nachweisbar ist.

Dafür wurden die einzelnen T-Klone wie unter 2.2.2.1 beschrieben im Doppelansatz mit 0,5 µg des Reporterplasmid pTRE2-Luc transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h in Versuchsmedium kultiviert, wobei jeweils einem Ansatz pro T-Klon 1 µg Doxycyclin pro ml Medium zugesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente der Ansatz ohne Doxycyclin.

Anschließend wurde mit den Zellen ein Luziferase-Assay (s. 2.2.3) durchgeführt. Hierbei ließen sich Unterschiede in den Klonen der verschiedenen Zelllinien aber auch innerhalb einer Zelllinie feststellen.

Die T-Klone der RGL3-Linie zeigten im Durchschnitt eine mäßige Induzierbarkeit um das vier- bis siebenfache. Dabei war die Luziferase-Aktivität in den nicht mit

Doxycyclin behandelten Zellen jedoch deutlich erhöht (s. Abb. 3.1). Dies sprach für eine ständige Expression des Luziferase-Gens auf dem Reporterplasmid, die durch das Tet-On System nicht vollständig reguliert werden konnte. In Abb. 3.1 sind beispielhaft die Klone RGL3 T13 und T20 dargestellt.

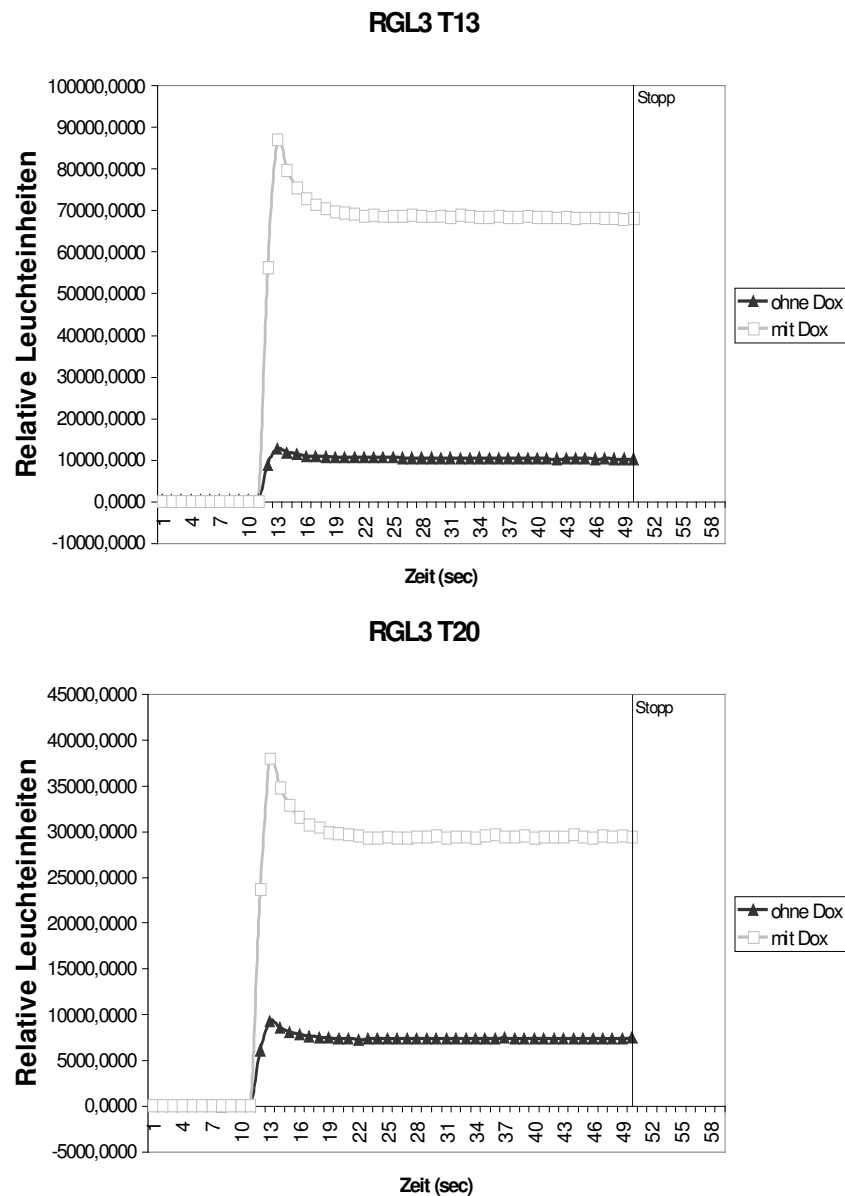


Abb. 3.1 Induktionskurven der RGL3 T-Klone im Luziferase-Assay

Die RLE wurden in Abständen von einer Sekunde gemessen. Nach 10 sec wurde im Luminometer automatisch das Substrat Luziferin zugegeben und die Reaktion somit gestartet. Nach 50 sec wurde die Messung beendet.

Dox: Doxycyclin 1 µg/ml

Um eine Möglichkeit zu finden, bei der zweiten stabilen Transfektion der RGL3 T-Klone die erhöhte Basalexpression des Responseplasmids zu unterdrücken, wurde

zunächst ein weiterer Luziferase-Assay unter Einsatz eines „Transcriptional Silencers“ (s. 3.1.3) durchgeführt.

Bei den T-Klonen der LN18-Zelllinie zeigte sich in vielen Fällen eine sehr gute Induzierbarkeit der Luziferase-Expression. Die Stärke der Induktion wurde in relativen Leuchteinheiten (RLE) am Luminometer gemessen und betrug nach Doxycyclingabe im Vergleich zur Negativkontrolle das zwanzig- bis einhundertfache je nach T-Klon. Als Maß für die Induzierbarkeit der Genexpression errechnete das Gerät zusätzlich die Fläche unter den Induktionskurven. Dabei war die Basalexpression der Luziferase in der Negativkontrolle ohne Doxycyclin im Vergleich zum Leerwert kaum erhöht.

Einige Beispiele zeigt Abb. 3.2. Zur weiteren Verwendung im Tet-On System wurden die Klone LN18 T5, T8, T9 und T11 ausgewählt.

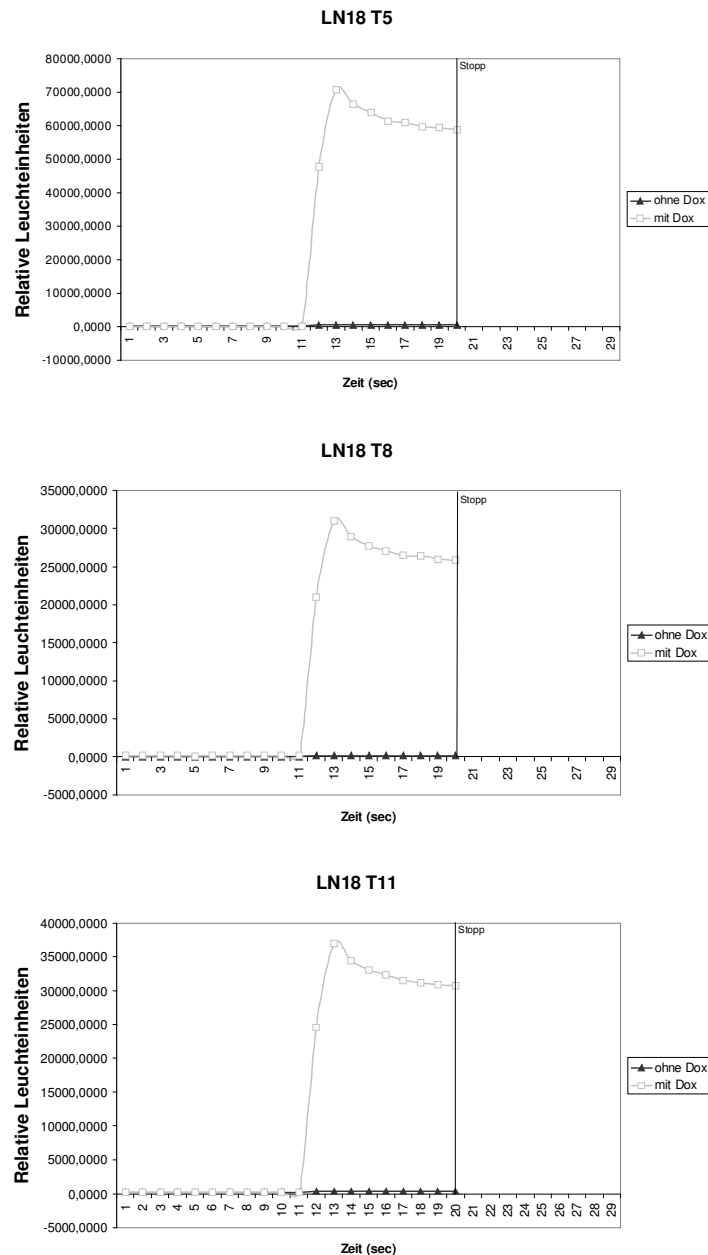


Abb. 3.2 Induktionskurven von LN18 T-Klonen im Luziferase-Assay

Die RLE wurden in Abständen von einer Sekunde gemessen. Nach 10 sec wurde im Luminometer automatisch das Substrat Luziferin zugegeben und die Reaktion somit gestartet. Nach 20 sec wurde die Messung beendet.

Dox: Doxycyclin 1 µg/ml

Bei der Zelllinie LN229 konnten trotz einer großen Anzahl von untersuchten Klonen keine T-Klone gefunden werden, die eine Induzierbarkeit der Genexpression in Abhängigkeit von der Doxycyclinkonzentration zeigten. Die meisten Klone ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Lichtemission (als Maß für die

Luziferase-Expression) mit und ohne Doxycyclingabe erkennen. Beispielhaft wird in Abb. 3.3 die Induzierbarkeit der Genexpression der Klone LN229 T2, T3, T6, T8, T12 und T17 gezeigt. Die gemessenen Werte unterschieden sich außerdem nicht wesentlich von denen des Leerwertes, was ebenfalls auf eine nur schwache Produktion von Luziferase hinwies. Auf Grund dessen wurden für die später folgende zweite stabile Transfektion keine T-Klone der Zelllinie LN229 verwendet.

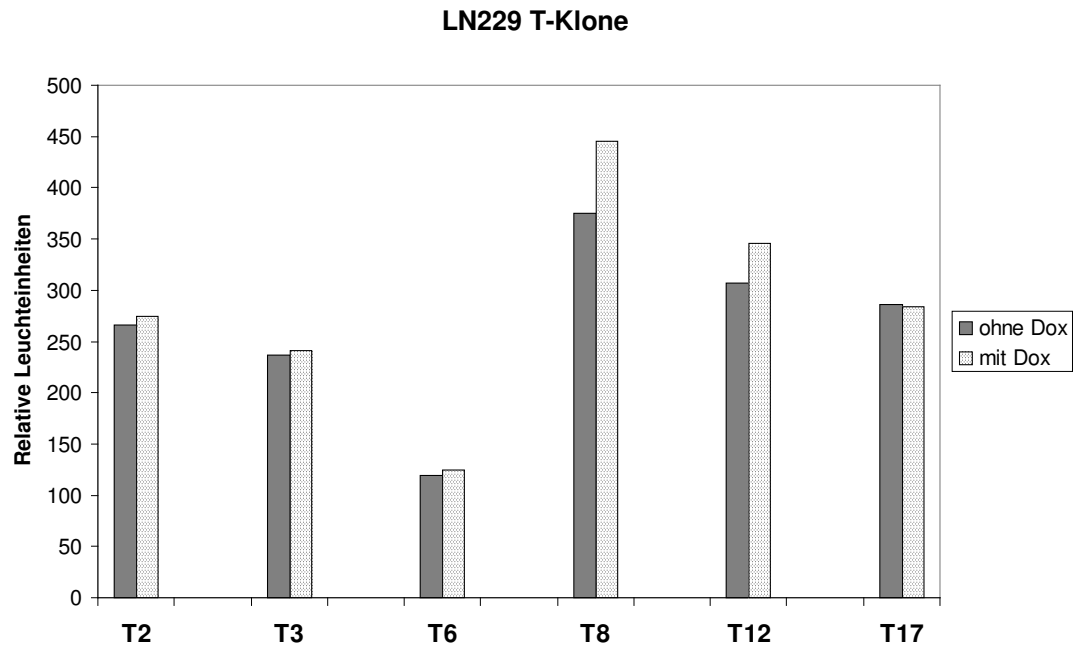


Abb. 3.3 Induktion der Genexpression bei LN229 T-Klonen im Luziferase-Assay

Die gemessenen Werte entstanden durch Integration der Fläche unter den Induktionskurven im Luziferase-Assay. Der Leerwert wurde bereits abgezogen.

Dox: Doxycyclin 1 µg/ml

3.1.2.2 Auswirkung unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf das Tet-On System

Neben der Charakterisierung der T-Klone wurde der Luziferase-Assay noch für zwei weitere Versuche eingesetzt.

Zum einen wurde untersucht, ob sich durch höhere Dosen an Doxycyclin die Induzierbarkeit steigern lässt. Dazu wurden die Klone RGL3 T13, T19 und T20 wiederum für einen Luziferase-Assay transient transfiziert (s. 2.2.2.1). Die Induktion erfolgte dann zum einen mit der üblichen Dosis von 1 µg/ml Doxycyclin im Versuchsmedium und zum anderen mit der Dosis von 5 µg/ml. Als Negativkontrolle wurde wieder ein Ansatz ohne Doxycyclin mitgeführt.

Die Messwerte zeigten, dass sich auch durch sehr hohe Gaben von Doxycyclin die Genexpression im Luziferase-Assay nicht mehr weiter steigern ließ (s. Abb. 3.4), so dass alle weiteren Versuche mit den vom Hersteller empfohlenen 1 µg/ml Doxycyclin durchgeführt wurden.

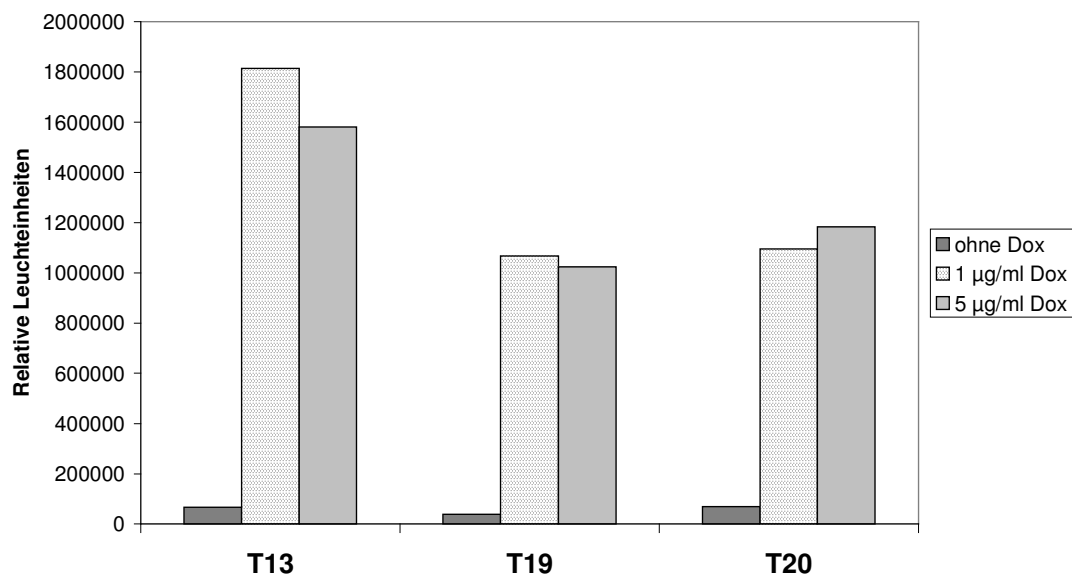


Abb. 3.4 Induzierbarkeit der Genexpression in RGL3 T-Klonen durch unterschiedlich hohe Gaben an Doxycyclin

Die gemessenen Werte entstanden durch Integration der Fläche unter den Induktionskurven im Luziferase-Assay. Der Leerwert wurde bereits abgezogen.

Dox: Doxycyclin

In einem weiteren Versuch wurde im Luziferase-Assay das FCS des Kulturmediums im Vergleich zum „Tet-System Approved FBS“ des Versuchsmediums untersucht. Da in der Tierzucht Tetracycline zur Krankheitsbekämpfung eingesetzt werden, können im FCS Kontaminationen mit Tetracyclinen vorkommen, die dann als Induktoren des Tet-On Systems wirken könnten. Aus diesem Grund sollten Zellen, die doppelt-stabil mit Tet-On Vektoren transfiziert wurden, nur in Medium gehalten werden, das nachweislich keine Tetracycline enthält, um eine Dauerstimulation zu vermeiden.

Nach der transienten Transfektion (s. 2.2.2.1) wurden Zellen des Klons LN18 T5 zum einen in Kultur- zum anderen in Versuchsmedium kultiviert. Zu beiden Ansätzen wurde außerdem 1 µg Doxycyclin pro ml Medium gegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Parallelansatz ohne Doxycyclin mitgeführt.

Im Luziferase-Assay zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medien (s. Abb. 3.5). Bei einer Verunreinigung des FCS durch Tetracycline wäre am ehesten eine erhöhte Basalexpression in der Negativkontrolle des Ansatzes in Kulturmedium zu erwarten gewesen.

Da eine Kontamination des Kulturmediums mit Tetracyclinen somit nicht wahrscheinlich war, wurden die T-Klone weiterhin in diesem Medium gehalten. Auch wurde in den nachfolgenden Versuchen das Versuchsmedium durch normales Kulturmedium ersetzt.

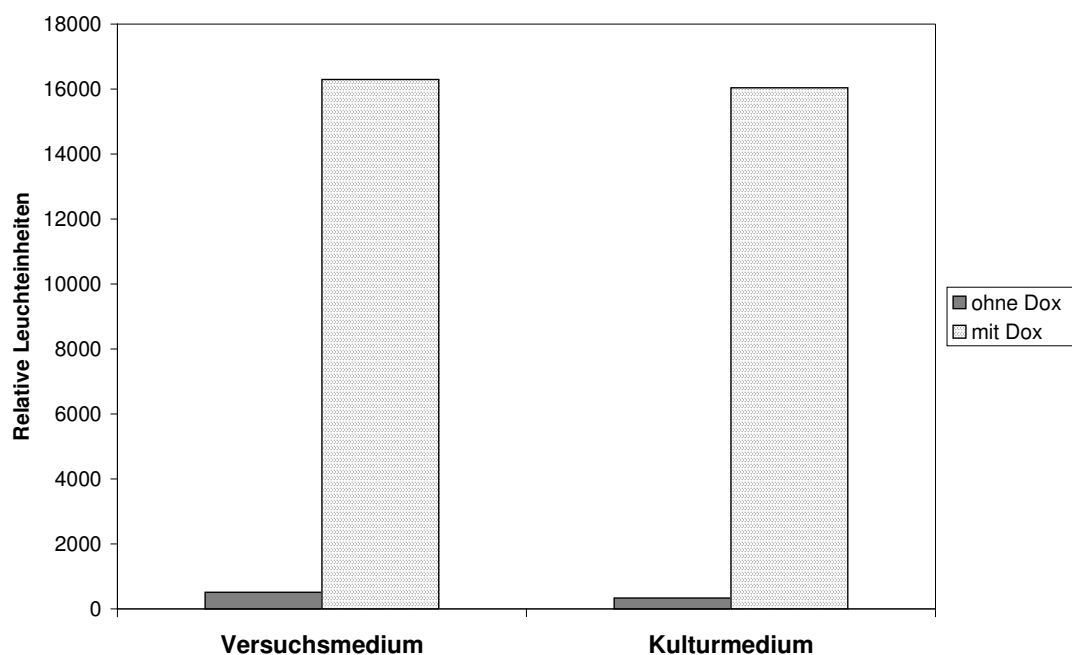


Abb. 3.5 Induzierbarkeit der Genexpression im LN18 T5-Klon in unterschiedlichen Kulturmedien

Die gemessenen Werte entstanden durch Integration der Fläche unter den Induktionskurven im Luziferase-Assay. Der Leerwert wurde bereits abgezogen. Das Versuchsmedium enthielt „Tet-System approved FBS“, das Kulturmedium FCS der Charge 097L (s. Material und Methoden).

Dox: Doxycyclin 1µg/ml

3.1.3 Auswirkungen des „Silencers“ auf RGL3 T-Klone

Der „Transcriptional Silencer“ (Clontech) ist in der Lage, eine in Abwesenheit von Doxycyclin auftretende Basalexpression des „gene of interest“ in den T-Klonen zu unterdrücken. Dabei blockiert das entstehende tTS-Protein durch Bindung an die TRE-Region die unkontrollierte Transkription des Responseplasmids, während es die

Induzierbarkeit des Tet-On Systems durch Doxycyclin unbeeinflusst lässt. Dies ist schematisch in Abb. 3.6 dargestellt.

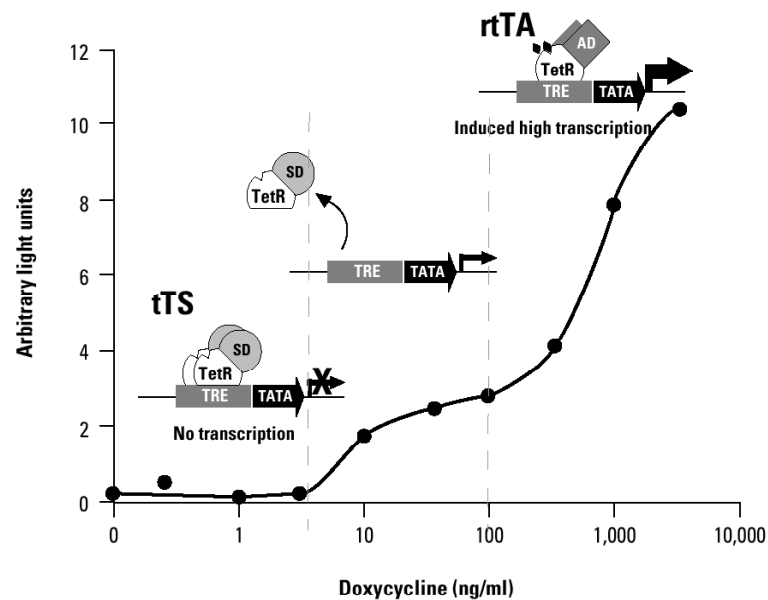


Abb. 3.6 Wirkungsweise des „Transcriptional Silencers“

(aus der Produktbeschreibung der Firma Clontech)

TetR: Tet Repressor Protein

SD: Silencing Domain

TRE: Tet-Response Element

rtTA: reverse tetracycline-controlled Transactivator

AD: Aktivator-domäne des VP16-Proteins des Herpes simplex-Virus

tTS: tetracycline-controlled Transcriptional Silencer

In Abwesenheit von Doxycyclin bindet tTS an die tetO-Sequenz (tet Operator) der TRE-Region und inhibiert dadurch die Transkription des „gene of interest“. Durch Zugabe von Doxycyclin dissoziiert tTS von der TRE-Region. Bei ausreichenden Doxycyclin-Konzentrationen bindet dann rtTA an die TRE-Region, so dass die Transkription aktiviert wird.

Um diesen Effekt auf die erhöhte Basalexpression in den RGL3 T-Klonen beurteilen zu können, wurde der „Silencer“ zunächst im Luziferase-Assay eingesetzt. Dabei wurden die Klone RGL3 T13, T19 und T20 jeweils im Doppelansatz mit 0,5 µg pTet-tTS und 0,1 µg ptTS-Control transient cotransfiziert (s. 2.2.2.1 und 2.3.1.4). Anschließend wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank kultiviert, wobei jeweils einem Ansatz pro T-Klon 1 µg/ml Doxycyclin zugesetzt wurde.

Mit den so behandelten Zellen wurde dann ein Luziferase-Assay (s. 2.2.3) durchgeführt, dessen Ergebnis in Abb. 3.7 beispielhaft an den Klonen RGL3 T13 und T20 dargestellt ist. In allen verwendeten T-Klonen konnte die Luziferase-Expression

bei den Negativkontrollen deutlich gemindert werden. Dadurch erhöhte sich die Induzierbarkeit der Transkription nach Doxycyclin-Gabe auf das 15- bis 30-fache im Vergleich zur Negativkontrolle.

Da sich schon bei der transienten Transfektion gezeigt hat, dass das pTet-tTS Plasmid in der Lage ist, eine unkontrollierte Genexpression im Responseplasmid zu inhibieren, wurde es für die RGL3 T-Klone auch bei der zweiten stabilen Transfektion (s. 2.2.2.2) verwendet. Für diesen Schritt wurden die Klone RGL3 T13, T19 und T20 ausgewählt.

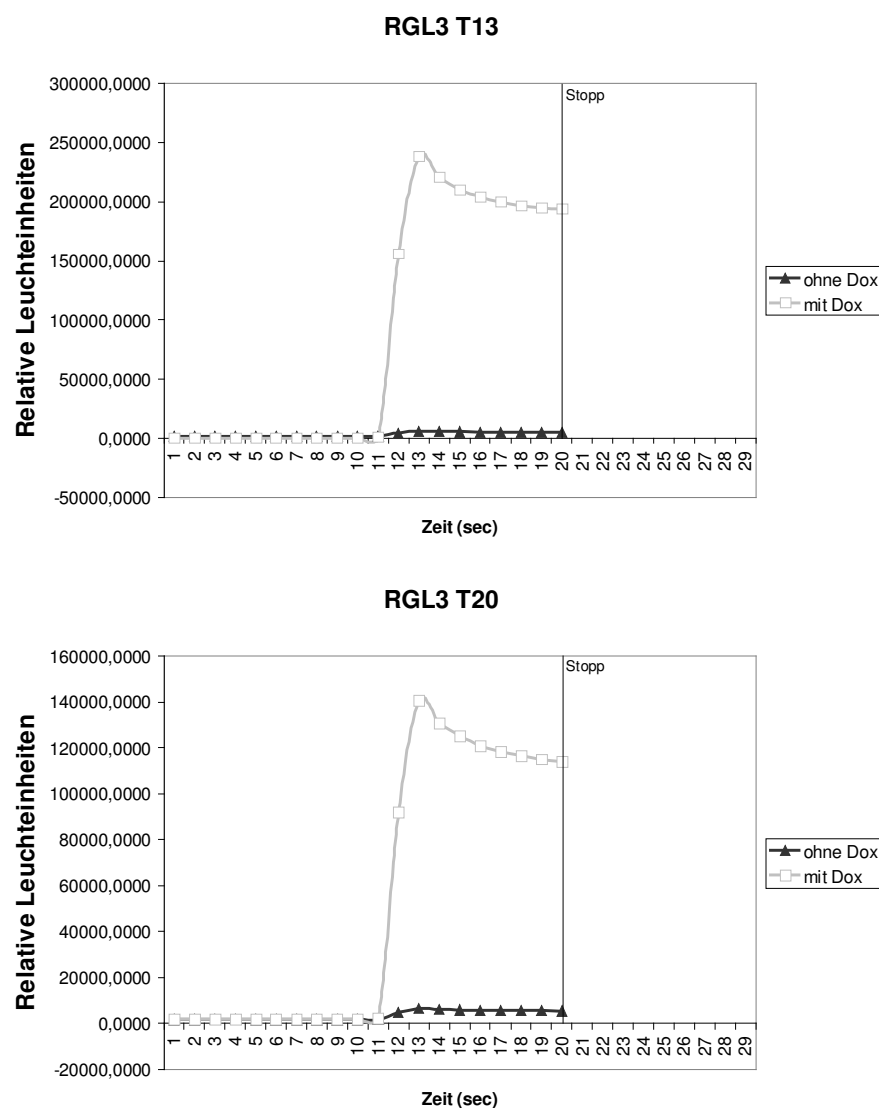


Abb. 3.7 Induktionskurven der RGL3 T-Klone im Luziferase-Assay nach Transfektion mit pTet-tTS

Die RLE wurden in Abständen von einer Sekunde gemessen. Nach 10 sec wurde im Luminometer automatisch das Substrat Luziferin zugegeben und die Reaktion somit gestartet. Nach 20 sec wurde die Messung beendet.

Dox: Doxycyclin 1 µg/ml

3.1.4 Klonierung der Responseplasmide im Tet-On System

Für die zweite stabile Transfektion im Tet-On System wurde jeweils für die murine und die humane Zelllinie ein entsprechendes Plasmidkonstrukt benötigt, das sich aus dem pTRE2-Vektor (s. 2.3.1.2) und der Nukleotidsequenz für murines bzw. humanes MIF in antisense-Orientierung zusammensetzt.

Dazu wurde das Responseplasmid pTRE2 mit den Restriktionsenzymen Hind III und BamHI verdaut (s. 2.4.3.1) und wie unter 2.4.3.4 beschrieben mit Hilfe einer Gelextraktion aufgereinigt.

Zur Herstellung des Inserts wurde jeweils mit muriner und humaner mRNA eine reverse Transkription (s. 2.4.2.1) durchgeführt. Die daraus entstandene cDNA diente als Matrize für eine nachfolgende PCR (s. 2.4.2.3) mit den entsprechenden sense- und antisense-Primern für muMIF bzw. huMIF. Die sense-Primer waren so konstruiert, dass sie das 5'-Ende des MIF-Gens umfassten und bei der PCR eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII einfügten. Die antisense-Primer dagegen umfassten den terminalen 3'-Bereich des MIF-Gens und enthielten zusätzlich eine Schnittstelle für BamHI (s. 2.4.2.2).

Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt (s. 2.4.3.4) mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und erneut über eine Gelextraktion aufgereinigt (s. Abb. 3.8).

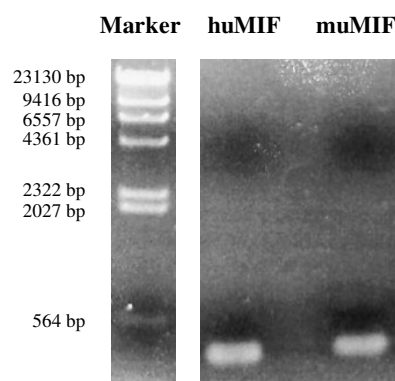


Abb. 3.8 Agarosegelelektrophorese von muriner und humaner MIF-DNA nach Restriktionsverdau mit HindIII und BamHI
Marker: HindIII-verdaute λ -Phagen-DNA

Die Ligation des linearisierten pTRE2-Vektors mit den entsprechenden Inserts erfolgte mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Novagen) und anschließender Kontrolle durch Ligation-PCR (s. 2.4.2.4). Dabei entstanden Plasmidkonstrukte, die die Sequenz für murines bzw. humanes MIF in antisense-Orientierung enthielten. Im Folgenden werden die Konstrukte als pTRE2-as-muMIF und pTRE2-as-huMIF bezeichnet.

Nach Transformation in kompetente Zellen (OneShot Top10) wurde mit Hilfe der Colony-PCR (s. 2.4.2.5) eine Bakterienkolonie zur weiteren Amplifizierung der Plasmide ausgewählt. Dies wird beispielhaft in Abb. 3.9 gezeigt. Die einklonierten Fragmente wurden mittels Sequenzierung (s. 2.4.3.7) mit dem pTRE2-sense-Primer auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

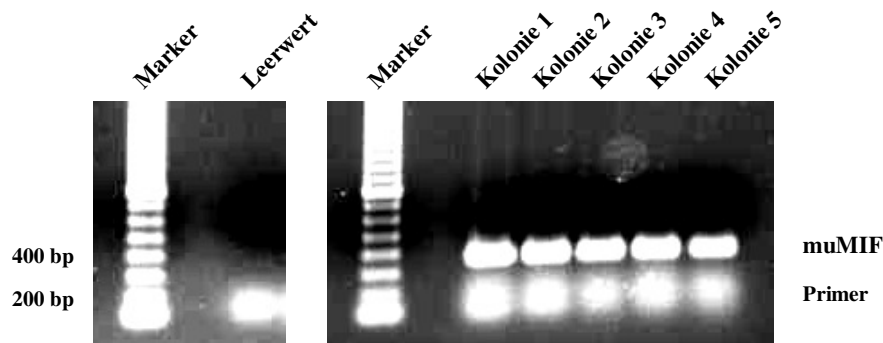


Abb. 3.9 Colony-PCR nach Transformation des Plasmidkonstrukts pTRE2-as-muMIF in kompetente Zellen

Marker: 100 bp-Marker

In allen 5 Bakterienkolonien konnte mittels PCR muMIF-DNA nachgewiesen werden. Zur weiteren Verwendung wurde Kolonie 1 ausgewählt.

3.1.5 Zweite stabile Transfektion der T-Klone mit dem Responseplasmid

Die zweite stabile Transfektion erfolgte, um die Expression der antisense-mRNA von muMIF und huMIF in den Glioblastomzelllinien unter die Kontrolle des Tetracyclin-sensitiven Promotors des Tet-On Systems zu stellen.

Dazu wurden die humanen Klone LN18 T5, T8, T9 und T11 wie unter 2.2.2.2 beschrieben mit 0,2 µg pTK-Hyg und 2,0 µg pTRE2-as-huMIF stabil transfiziert. Ein Parallelansatz wurde mit 0,2 µg pTK-Hyg und 2,0 µg des leeren pTRE2-Vektors transfiziert, um bei der späteren Charakterisierung der antisense-Klone eine

Kontrollzelllinie zur Verfügung zu haben, die keine as-mRNA für MIF produziert. Bei der Cotransfektion mehrerer Plasmide geht man davon aus, dass Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch weitere Plasmide aufnehmen. Das Verhältnis von 1:10 zwischen den beiden Plasmiden wurde so gewählt, um unter den Hygromycin-resistenten Klonen möglichst viele zu finden, die gleichzeitig auch das Responseplasmid aufgenommen haben. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mit 100 µg/ml Hygromycin B im Kulturmedium über 4 Wochen.

Die murinen Klone RGL3 T13, T19 und T20 benötigten aufgrund der starken unkontrollierten Basalexpression (s. 3.1.2) eine zusätzliche Transfektion mit dem „Transcriptional Silencer“. Diese Klone wurden dementsprechend mit 0,2 µg pTK-Hyg, 1,0 µg pTRE2-as-muMIF bzw. leerem pTRE2-Vektor und 2,0 µg pTet-tTS stabil transfiziert (s. 2.2.2.2). Die Selektion der resistenten Klone wurde über 4 Wochen mit 200 µg/ml Hygromycin B im Kulturmedium durchgeführt. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Zellen der RGL3-Zelllinie weniger Hygromycin B-sensibel waren als die Zellen der Linie LN18, so dass hier eine höhere Dosis des Antibiotikums zur Selektion notwendig war.

Anschließend erfolgte die Isolierung einzelner doppelt-stabil transfizierter Klone sowohl der murinen als auch der humanen Zellen. Hierbei erwies sich in beiden Fällen die Methode des Ausplattierens (s. 2.1.6.3) als die effizienteste.

Die Zellklone mit integriertem „leeren“ pTRE2-Vektor wurden als RGL3 TCtrl bzw. LN18 TCtrl bezeichnet. Diejenigen T-Klone, die mit dem antisense-Plasmidkonstrukt stabil transfiziert wurden, erhielten die Bezeichnung „as“ und eine fortlaufende Nummer (z. B. LN18 T5as2). Allgemein wurden die Zellklone nach der zweiten stabilen Transfektion als T-as-Klone bezeichnet.

Die so entstandenen mit Tetracyclin induzierbaren MIF-antisense-Klone wurden im Folgenden mit Hilfe von Northern Blots (s. 3.3) auf ihre mRNA-Produktion hin untersucht.

3.2 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Sondenherstellung

Für die Charakterisierung der MIF-antisense-Klone im Northern Blot werden entsprechende markierte RNA-Sonden benötigt. Um diese herstellen zu können, wurden die Nukleotidsequenzen von murinem und humanem MIF in Vektoren mit T7- und/oder Sp6-Promotor-Stellen kloniert und anschließend eine *in vitro*-Transkription durchgeführt.

3.2.1 Klonierung von Plasmiden für die *in vitro*-Transkription

3.2.1.1 Klonierung einer für murinen MIF kodierenden Sequenz in den pCRII-Vektor

Um den pCRII-Vektor für eine Klonierung verwenden zu können, bei der das Insert in einer definierten Orientierung integriert werden soll, muss die TA Cloning Site aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Dazu wurde der pCRII-Vektor mit EcoRI verdaut (s. 2.4.3.1) und nach Aufreinigung über eine Gelextraktion (s. 2.4.3.4) wieder religiert. Nach Transformation in kompetente DH5 α -Zellen (s. 2.4.1.1) wurde der aufgereinigte, religierte Vektor amplifiziert und schließlich mittels Maxiprep (s. 2.4.1.3) isoliert.

Zur Herstellung des Plasmidkonstruktes pCRII-s-muMIF wurde der religierte pCRII-Vektor dann mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI linearisiert und anschließend über eine Gelextraktion (s. Abb. 3.10) aufgereinigt.

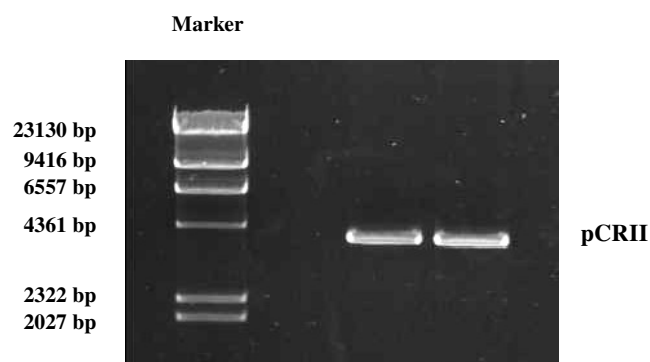


Abb. 3.10 Agarosegelelektrophorese des linearisierten pCRII-Vektors
Marker: HindIII verdaute λ -Phagen-DNA

Das Insert wurde über eine RT-PCR mit dem Primerpaar muMIF sense/antisense (s. 2.4.2.2) generiert. Als Matrize hierfür diente murine mRNA aus Zellen der RGL3-Zelllinie. Nach der Amplifikation mittels PCR wurden die entstandenen DNA-Fragmente über eine Gelextraktion aufgereinigt (s. Abb. 3.11). Dabei entsprach das RT-PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 370 bp der murinen MIF-DNA.

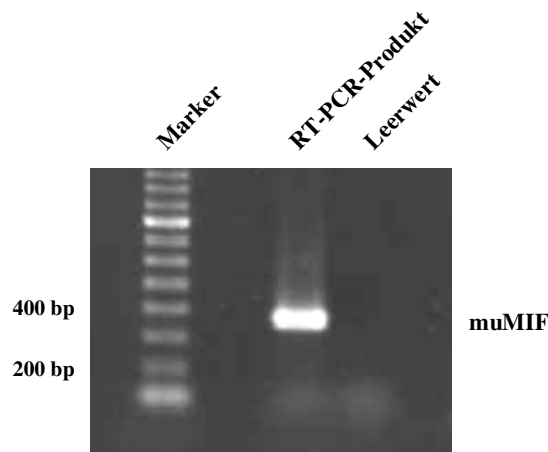


Abb. 3.11 Agarosegelelektrophorese von muriner MIF-DNA nach RT-PCR
Marker: 100 bp-Marker

Durch das Primerpaar wurden dem PCR-Produkt Schnittstellen für die Enzyme HindIII in 5'-Position und für BamHI in 3'-Position hinzugefügt. Nach dem Verdau des PCR-Produktes mit diesen beiden Enzymen, erfolgte eine Ligation (s. 2.4.3.3) mit dem linearisierten pCRII-Vektor mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Novagen). Die stattgefundenene Ligation konnte mit Hilfe einer Ligation-PCR (s. 2.4.2.4 und Abb. 3.12) mit den Sp6- und T7-Primern nachgewiesen werden. Dabei entstand in der PCR ein ~530 bp großes Fragment, was dem einklonierten Insert mit den angrenzenden Vektorbereichen entsprach. Durch die Ligation wurde das Insert in sense-Orientierung in den Vektor integriert. Das entstandene Plasmidkonstrukt wird im Folgenden als pCRII-s-muMIF bezeichnet.



Abb. 3.12 Ligation-PCR des Plasmidkonstrukts pCRII-s-muMIF

Marker : 100 bp-Marker

Nach Transformation des Plasmidkonstruktes in kompetente Zellen (OneShot Top10) wurden 5 Ampicillin-resistente Bakterienkolonien einer Colony-PCR mit dem Primerpaar muMIF sense/antisense (s. 2.4.2.5 und Abb. 3.13) unterzogen und anschließend eine Kolonie (Kolonie 2) für eine präparative Plasmidisolierung ausgewählt (s. 2.4.1.3). Eine letzte Kontrolle des Plasmidkonstruktes pCRII-s-muMIF erfolgte durch Sequenzierung bei der Firma MWG Biotech.

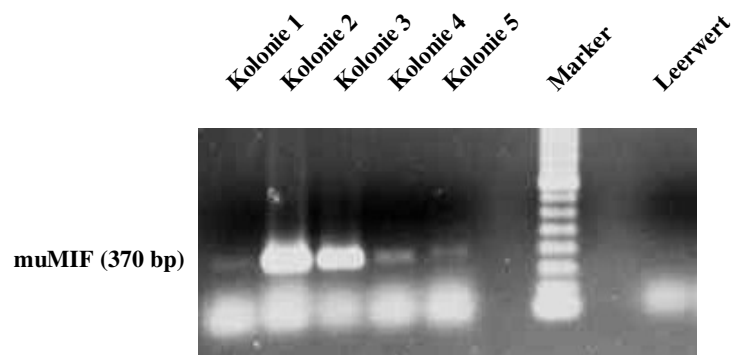


Abb. 3.13 Colony-PCR nach Transformation des Plasmidkonstruktes pCRII-s-muMIF in kompetente Zellen

Marker: 100 bp-Marker

In allen 5 Kolonien konnte mittels PCR muMIF-DNA nachgewiesen werden, v. a. jedoch in den Kolonien 2 und 3. Zur weiteren Verwendung wurde Kolonie 2 ausgewählt.

3.2.1.2 Klonierung einer für humanen MIF kodierenden Sequenz in pcDNA3.1/myc-His A-Vektoren

Zur Herstellung der Konstrukte pcDNA3.1(+)-s-huMIF und pcDNA3.1(-)-as-huMIF wurden die (+)- und die (-)-Versionen des pcDNA3.1/myc-His A-Vektors zunächst mit den Enzymen HindIII und BamHI geschnitten (s. 2.4.3.1) und wie unter 2.4.3.5 beschrieben aufgereinigt. Da der pcDNA3.1/myc-His A-Vektor zur Religation neigt (mündliche Mitteilung von PD Dr. Michael Bacher, ehemals Universität Marburg, Institut für Immunologie), wurde vor der Ligation eine Dephosphorylierung mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (s. 2.4.3.2) durchgeführt.

Das Insert wurde mittels PCR (s. 2.4.2.3) mit dem Primerpaar huMIF sense/antisense (s. 2.4.2.2) hergestellt. Als Matrize hierfür diente humane cDNA, die mir freundlicherweise von PD Dr. Michael Bacher zur Verfügung gestellt wurde. Bei der PCR wurde am 5'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments eine Schnittstelle für HindIII generiert, am 3'-Ende eine für BamHI. Nach Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit diesen beiden Enzymen und Aufreinigung über eine Säule (s. 2.4.3.5) erfolgte die Ligation (s. 2.4.3.3) mit den linearisierten Vektoren pcDNA3.1/myc-His A(+) und (-) unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase (Promega). Die entstandenen Konstrukte wurden in kompetente JM109 transformiert. Aus den gewachsenen Ampicillin-resistenten Kolonien wurden die Plasmide mittels MiniPrep isoliert (s. 2.4.1.3) und einem Kontrollverdau mit HindIII und EcoRV unterzogen. Bei den Konstrukten, die das humane MIF als Insert aufgenommen hatten, wurde dabei ein etwa 370 bp langes Fragment herausgeschnitten. Abb. 3.14 zeigt, dass trotz vorheriger Dephosphorylierung des linearisierten Vektors eine hohe Rate an Religationen stattgefunden hat. Die beiden Konstrukte mit dem aufgenommenen Insert wurden zur weiteren Verwendung in kompetenten JM109 amplifiziert und anschließend einer präparativen Plasmidisolierung mittels Maxiprep (s. 2.4.1.3) unterzogen.

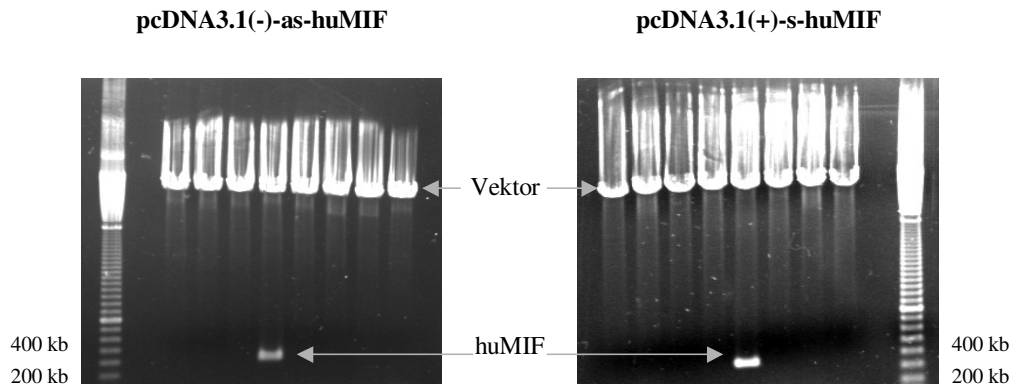


Abb. 3.14 Agarosegelelektrophorese nach Restriktionsverdau der Plasmidkonstrukte **pcDNA3.1(-)-as-huMIF** und **pcDNA3.1(+)-s-huMIF**
 Marker: 100 bp-Marker

3.2.2 Herstellung von RNA-Sonden für Northern Blots

Die Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden erfolgte wie unter 2.4.4.3 beschrieben durch in vitro-Transkription.

Mit Hilfe des Plasmidkonstruktes pCRII-s-muMIF (s. 3.2.1.1) konnten die Sonden zur Detektion des murinen MIFs hergestellt werden. Die sense-Sonde (muMIF-s-Sonde) wurde nach Verdau des Plasmids mit BamHI durch die Sp6-Polymerase geschrieben. Für die antisense-Sonde (muMIF-as-Sonde) wurde das Plasmid mit dem Enzym HindIII geschnitten und die T7-Polymerase zur Transkription verwendet.

Um eine sense-Sonde für humanen MIF (huMIF-s-Sonde) zu generieren, wurde das Plasmidkonstrukt pcDNA3.1(+)-s-huMIF (s. 3.2.1.2) mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten und anschließend eine in vitro-Transkription mit der T7-Polymerase durchgeführt. Zur Herstellung der entsprechenden antisense-Sonde (huMIF-as-Sonde) wurde pcDNA3.1(-)-as-huMIF (s. 3.2.1.2) mit BamHI verdaut und ebenfalls die T7-Polymerase angewendet.

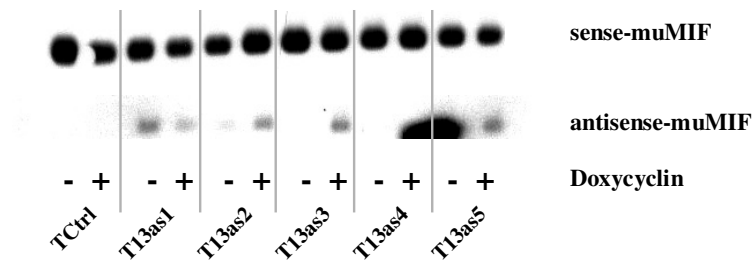
3.3 Charakterisierung der T-as-Klone mittels Northern Blot

Mit Hilfe von Northern Blots soll im Folgenden die Induzierbarkeit der doppelt-stabil transfizierten Zellklone durch Doxycyclin-Gabe untersucht werden. Dazu wurden je 200.000 Zellen pro well im Doppelansatz in 6-well-plates in Kulturmedium ausgesät und 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von 1 µg Doxycyclin pro ml Medium zur Hälfte der Versuchsansätze. Die andere Hälfte der Kulturen diente als Kontrolle, so dass für jeden T-as-Klon ein induzierter und ein nicht-induzierter Ansatz vorlagen. Die Zellkulturen wurden dann für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert bis der Zellrasen eine Konfluenz von etwa 90-100 % erreicht hatte. Nach Entfernung des Versuchsmediums erfolgten die Zelllyse und die RNA-Aufbereitung wie unter 2.4.4.1 beschrieben. Anschließend wurde ein Northern Blot wie unter 2.4.4.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden pro Spur 5 µg RNA aufgetragen. Die spezifische Detektion der durch die T-as-Klone produzierten MIF-as-mRNA gelang mit Hilfe einer DIG-markierten MIF-s-Sonde (s. 3.2.2). Auf einer zweiten Membran wurde der Gehalt an MIF-s-mRNA durch Hybridisierung mit einer MIF-as-Sonde dargestellt. Auch hier wie schon im Luziferase-Assay zeigten sich Unterschiede zwischen murinen und humanen T-as-Klonen.

3.3.1 T-as-Klone der murinen Zelllinie RGL3

Wie schon im Luziferase-Assay ließ sich auch nach der zweiten stabilen Transfektion die mRNA-Synthese der murinen T-as-Klone schlechter durch Doxycyclin induzieren als die der humanen T-as-Klone, so dass im Northern Blot nur relativ geringe Mengen an muMIF-as-mRNA zu detektieren waren. In einigen T-as-Klonen fand auch gar keine Expression von muMIF-as-mRNA statt. Außerdem fiel auf, dass trotz Einsatzes des „silencers“ die Zellen auch im Doxycyclin-freien Medium immer noch muMIF-as-mRNA produzierten. Dies ist beispielhaft in Abb. 3.15a) und b) anhand von mehreren RGL3 T13as- und T19as-Klonen gezeigt.

a) RGL3 T13as-Klone



b) RGL3 T19as-Klone

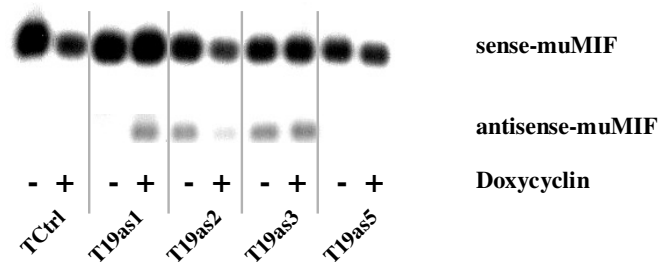


Abb. 3.15a) und b) Northern Blot zum Screening der RGL3 T13as- und T19as-Klone

Die Ladekontrolle erfolgte mittels Methylenblau-Färbung (Daten nicht gezeigt)

Doxycyclin - : Ansatz ohne Doxycyclin, Doxycyclin + : Ansatz mit Doxycyclin

Am ehesten entsprach in diesem Screening der Klon RGL3 T13as3 der Anforderung guter Induzierbarkeit bei vernachlässigbarem Leak, so dass dieser zusammen mit den Klonen RGL3 T13as4 und T13as5 in einem weiteren Northern Blot überprüft wurde (s. Abb. 3.16). Dabei stellte sich heraus, dass nur der Klon RGL3 T13as3 für weitere Versuche eingesetzt werden konnte, auch wenn die Produktion an muMIF-as-mRNA relativ schwach war. RGL3 T13as4 und T13as5 zeigten dagegen keine Induzierbarkeit der muMIF-as-mRNA-Synthese.

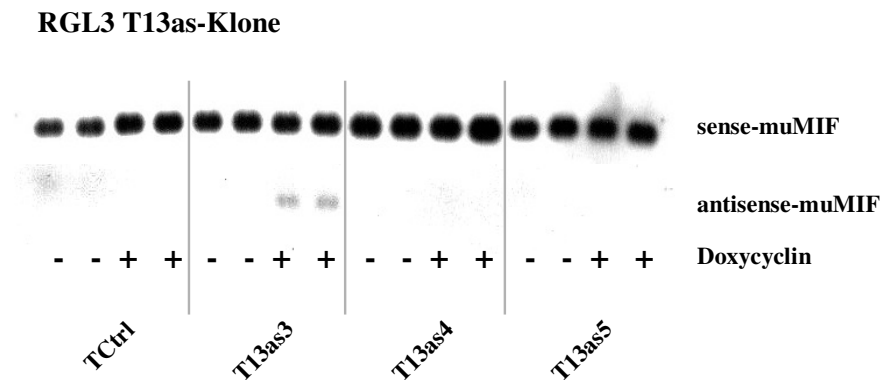


Abb. 3.16 Northern Blot zur Kontrolle der T-as-Klone RGL3 T13as3, T13as4 und T13as5

Die Ladekontrolle erfolgte mittels Methylenblau-Färbung (Daten nicht gezeigt)

Doxycyclin - : Ansatz ohne Doxycyclin, Doxycyclin + : Ansatz mit Doxycyclin

Beim Vergleich der Spiegel an muMIF-s-mRNA konnte kein Unterschied zwischen den mit Doxycyclin behandelten und den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Somit schien die Produktion von muMIF-as-mRNA zumindest zum gewählten Zeitpunkt (48 h nach Doxycyclin-Gabe) keinen Einfluß auf die sense-mRNA-Produktion zu haben. Ob eine solche Beeinflussung zu einem anderen Zeitpunkt auftritt, wurde im Folgenden anhand einer Kinetik (s. 3.5) überprüft.

3.3.2 T-as-Klone der humanen Zelllinie LN18

Bei den humanen T-as-Klonen zeigte sich im Screening eine deutlich bessere Induzierbarkeit der mRNA-Synthese durch Doxycyclin als bei den murinen T-as-Klonen. Abb. 3.17 zeigt beispielhaft die Produktion von huMIF-as-mRNA in mehreren LN18 T5as- und T11as-Klonen. Hierbei fiel jedoch auf, dass das Tet-On System nicht in allen Klonen gleich gut zu induzieren war und einige LN18 T-as-Klone im Doxycyclin-freien Medium eine erhöhte Basalexpression an huMIF-as-mRNA aufwiesen. Für weitere Versuche schienen am ehesten die Klone LN18 T5as2 und T11as5 in Frage zu kommen, so dass mit mRNA dieser beiden Klone ein Kontroll-Northern Blot angefertigt wurde (s. Abb. 3.18). Dabei zeigte der Klon

LN18 T11as5 wie auch schon in Abb. 3.17 eine leicht erhöhte Basalexpression und zudem eine schlechtere Induzierbarkeit als T5as2, so dass im Folgenden von den humanen T-as-Klonen vor allem der Klon LN18 T5as2 eingesetzt wurde.

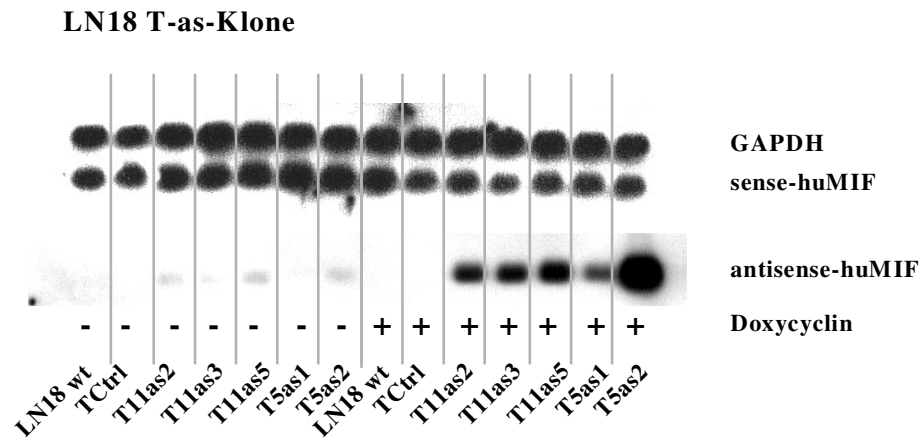


Abb. 3.17 Northern Blot zum Screening der LN18 T5as- und T11as-Klone

Die Ladekontrolle erfolgte über Co-Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-as-Sonde. wt: Wildtyp, Doxycyclin - : Ansatz ohne Doxycyclin, Doxycyclin + : Ansatz mit Doxycyclin

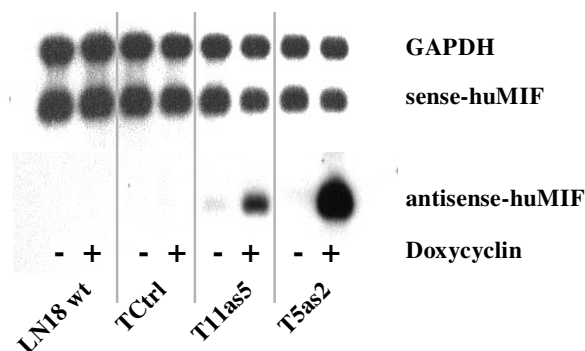


Abb. 3.18 Northern Blot zur Kontrolle der T-as-Klone LN18 T5as2 und T11as5

Die Ladekontrolle erfolgte über Co-Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-as-Sonde. wt: Wildtyp, Doxycyclin - : Ansatz ohne Doxycyclin, Doxycyclin + : Ansatz mit Doxycyclin

Beim Vergleich der Spiegel an huMIF-s-mRNA konnte hier ebenso wie bei den murinen T-as-Klonen kein Unterschied zwischen den mit Doxycyclin behandelten und den unbehandelten Versuchsansätzen festgestellt werden. In Kinetiken mit dem Klon LN18 T5as2 (s. 3.5 und 3.7) wurde im Folgenden überprüft, ob es zu einem

früheren oder späteren Zeitpunkt nach Doxycyclin-Gabe zu einer Beeinflussung der huMIF-s-Produktion durch die vorhandene as-mRNA kommt.

3.4 Einfluß der Doxycyclin-Dosis auf MIF-antisense-mRNA- und MIF-Protein-Gehalt

Um die Belastung für die T-as-Klone durch die wiederholten Doxycyclin-Gaben möglichst gering zu halten, wurde im Folgenden untersucht, ob auch mit einer geringeren Doxycyclin-Dosis eine ausreichende Induktion der mRNA-Synthese erreicht werden kann. Dies wurde mittels Northern Blot überprüft. Gleichzeitig wurde ein paralleler Versuchsansatz zur Gewinnung des intrazellulären Proteins (s. 2.4.5.1) angefertigt. Dieses wurde dann mit Hilfe eines Western Blots (s. 2.4.5.3) untersucht, um einen Hinweis auf eine eventuelle Beeinflussung der Proteinproduktion in den Zellen durch Doxycyclin zu erhalten. Für diesen „Doxycyclin-Assay“ wurden die humanen Klone LN18 T5as2 und T11as5 ausgewählt. Als Kontrolle diente ein Parallelansatz mit Zellen des humanen TCtrl-Klons. Für die mRNA- bzw. Protein-Gewinnung wurden pro Klon je 4 Petrischalen (Falcon Primaria, Ø 6 cm) mit jeweils 4×10^5 Zellen in 4 ml Kulturmedium vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel mit der Zugabe von 0, 0,2, 0,5 bzw. 1 µg/ml Doxycyclin zu den Zellen. Nach weiteren 48 h bei 37 °C im Brutschrank wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen entweder mit Trizol-Reagenz zur RNA-Gewinnung (s. 2.4.4.1) oder mit M-PER zur Proteingewinnung (s. 2.4.5.1) lysiert. Im Northern Blot (s. 2.4.4.2) wurden dann pro Spur 5 µg RNA auf zwei parallelen Gelen aufgetragen. Als Sonden wurden für die erste Membran eine huMIF-s-Sonde eingesetzt, bei der zweiten Membran fand eine Co-Hybridisierung mit der huMIF-as-Sonde und der GAPDH-as-Sonde statt.

Im Western Blot (2.4.5.2 und 2.4.5.3) wurden pro Spur 10 µg Protein aufgetragen und die unter 2.4.5.3 aufgeführten Antikörper verwendet.

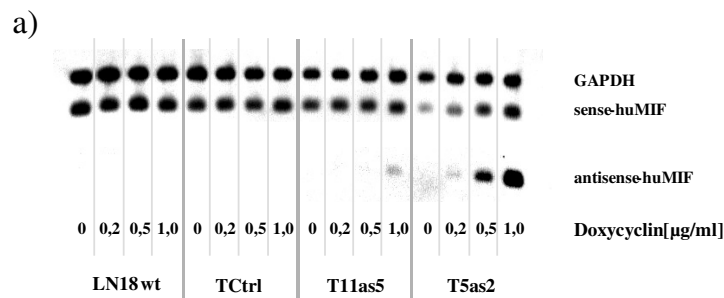


Abb. 3.19a) Northern Blot zum Doxycyclin-Assay

Die Ladekontrolle erfolgte über Co-Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-as-Sonde.
 wt: Wildtyp

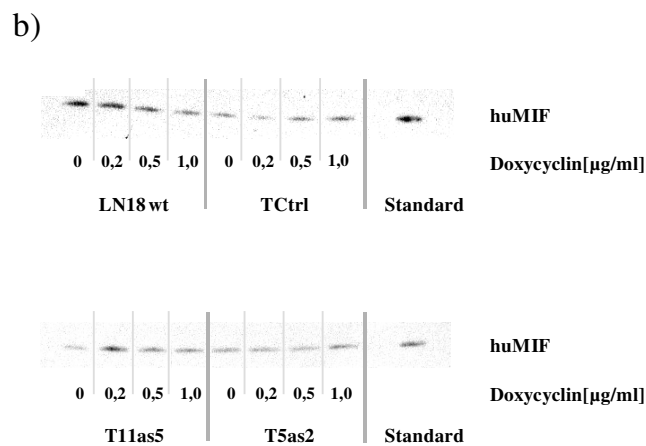


Abb. 3.19b) Western Blot zum Doxycyclin-Assay

Als Standard dienten 5 µl rekombinantes MIF (50 ng/ml).
 wt: Wildtyp

Abb. 3.19a) zeigt, dass schon bei der Gabe von 0,2 µg/ml Doxycyclin beim Klon LN18 T5as2 eine leichte Induktion des Tet-On Systems stattfand. Allerdings ließ sich die Produktion von huMIF-as-RNA durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin noch deutlich steigern.

LN18 T11as5 reagierte erst bei höheren Dosen an Doxycyclin und analog zu Abb. 3.18 auch mit einer deutlich geringeren Produktion an huMIF-as-mRNA.

Im Western Blot (s. Abb. 3.19b)) zeigte sich keine Beeinflussung der Produktion an intrazellulärem MIF-Protein durch die unterschiedlichen Gaben an Doxycyclin. Auch schien der Proteinspiegel zumindest zum gewählten Zeitpunkt von der Produktion an

huMIF-as-mRNA unabhängig zu sein. Dieser Punkt wurde jedoch in der weiteren Arbeit mit Hilfe von Kinetiken (s. 3.6 und 3.7) genauer untersucht.

Da es wie oben gezeigt erst bei einer Doxycyclin-Dosis von 1 µg/ml zu einer vollständigen Induktion des Tet-On Systems kam und auch die Proteinproduktion dadurch nicht beeinträchtigt wurde, wurde in den weiteren Versuchen immer eine Dosis von 1 µg Doxycyclin pro ml Medium eingesetzt.

3.5 Zeitlicher Verlauf der Produktion von MIF-antisense-mRNA in der Kurzzeitkinetik

Mit Hilfe einer Kinetik über 48 h wurde der Frage nachgegangen, ab welchem Zeitpunkt nach Doxycyclin-Gabe der Spiegel an MIF-as-mRNA ansteigt und wann er seinen Höhepunkt erreicht. Des Weiteren sollte eine eventuelle Beeinträchtigung der Produktion an MIF-s-mRNA durch das Vorhandensein der as-Stränge beurteilt werden.

3.5.1 T-as-Klone der murinen Zelllinie RGL3

Für die Kinetik wurden Zellen des Klons RGL3 T13as3 in Petrischalen (Falcon Primaria) ausgesät (je 600.000 Zellen pro Schale in Kulturmedium). Dabei wurden für jeden Zeitpunkt der Kinetik zwei Ansätze benötigt, um zu jeder mit Doxycyclin stimulierten Probe eine unbehandelte Kontrolle zu erhalten. 24 h nach Aussaat der Zellen erfolgte dann ein Mediumwechsel bei allen Schalen und die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zur Hälfte der Versuchsansätze. Zu den vorgegebenen Zeitpunkten (0, 0,5, 3, 6, 12, 24 und 48 h) wurde dann von den entsprechenden Schalen das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml Trizol-Reagenz lysiert. Ein Parallelansatz zur Kontrolle wurde mit dem murinen Klon RGL3 TCtrl durchgeführt. Bei den Zellen, die länger als 24 h in Kultur gehalten wurden, wurde alle 24 h erneut Doxycyclin (1 µg/ml) hinzugegeben.

Nach Präparation der RNA (s. 2.4.4.1) erfolgte ein Northern Blot mit 5 µg RNA pro Spur auf zwei parallelen Gelen. Zur Hybridisierung wurde für das erste Gel die muMIF-s-Sonde verwendet, für das zweite Gel fand eine Co-Hybridisierung mit der muMIF-as-Sonde und der GAPDH-as-Sonde statt.

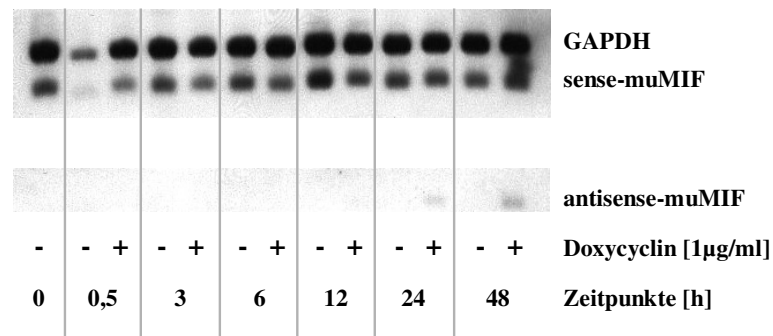


Abb 3.20 Northern Blot zur Kurzzeitkinetik des Klons RGL3 T13as3

Die Ladekontrolle erfolgte über eine Co-Hybridisierung mit der GAPDH-as-Sonde.

h: Stunden, Doxycyclin - : Ansatz ohne Doxycyclin, Doxycyclin + : Ansatz mit Doxycyclin

Abb. 3.20 zeigt, dass in dem Klon RGL3 T13as3 die muMIF-as-Produktion etwa 24h nach Doxycyclingabe einsetzte und bis zum 48 h-Wert noch etwas zunahm. Allerdings ist die Produktion an as-mRNA insgesamt sehr schwach. Die Spiegel an muMIF-s-mRNA erwiesen sich im Verlauf der Kinetik als konstant, so dass diese nicht durch das Vorhandensein der as-Stränge beeinflusst wurden. In dem Parallelansatz mit dem murinen TCtrl-Klon zeigten sich ebenfalls konstante muMIF-s-mRNA-Spiegel und erwartungsgemäß keine Produktion von muMIF-as-mRNA (Daten nicht gezeigt). Da sich die Induzierbarkeit des Tet-On Systems in dem Klon RGL3 T13as3 im Verlauf der längeren Kultivierung der Zellen immer weiter zu verschlechtern schien, wurde er in der weiteren Arbeit nicht mehr eingesetzt.

3.5.2 T-as-Klone der humanen Zelllinie LN18

Für die Kurzzeitkinetik wurde der humane Klon LN18 T5as2 ausgewählt. In Falcon Primaria 6-well-plates wurden pro Schale 5×10^5 Zellen in Kulturmedium ausgesät

und für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für jeden Zeitpunkt der Kinetik waren zwei Versuchsansätze notwendig, um jeweils eine mit Doxycyclin behandelte und eine unbehandelte Probe zu erhalten. Zur Kontrolle wurde ein Parallelansatz mit Zellen des humanen Klons LN18 TCtrl mitgeführt. Nach der Kultivierung über 48 h im Brutschrank wurde bei allen Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt und zur Hälfte der Schalen 1 µg/ml Doxycyclin zugegeben. Diese Doxycyclin-Gabe wurde alle 24 h wiederholt. Zu den vorgegebenen Zeitpunkten (0, 2, 8, 24 und 48 h) wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen lysiert. Die RNA-Präparation erfolgte über eine Säule nach Herstellerangaben (s. 2.4.4.1). Jeweils 2 µg RNA pro Spur wurden anschließend auf zwei parallelen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Northern-Membranen geblottet (s. 2.4.4.2). Zur Hybridisierung wurde bei der ersten Membran die huMIF-s-Sonde eingesetzt, bei der zweiten Membran fand eine Co-Hybridisierung mit der huMIF-as-Sonde und der GAPDH-as-Sonde statt. In der Abb. 3.21 ist dargestellt, dass 8 h nach Induktion des Tet-On Systems mit Doxycyclin huMIF-as-mRNA nachweisbar war. Der Gehalt an as-mRNA erreichte nach 24 h seinen Höhepunkt und blieb dann bis zum 48 h-Wert auf diesem Niveau. Der Spiegel an huMIF-s-mRNA blieb während der gesamten Kinetik konstant. In der Kontrolle mit dem humanen TCtrl-Klon konnte erwartungsgemäß keine huMIF-as-mRNA nachgewiesen werden und der Gehalt an huMIF-s-mRNA blieb auch hier konstant.

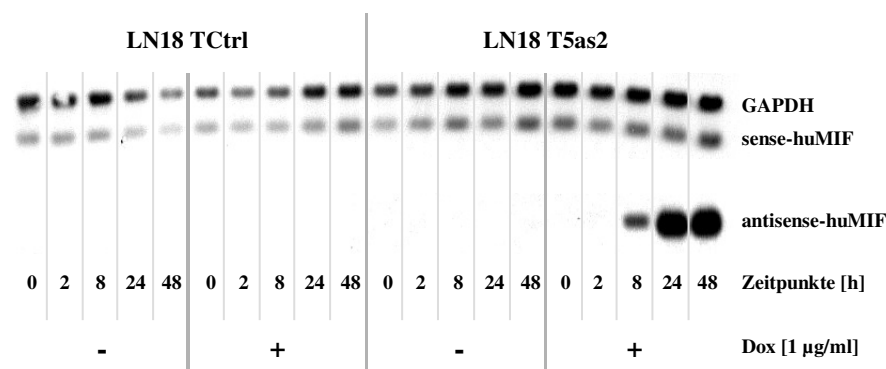


Abb. 3.21 Northern Blot zur Kurzzeitkinetik der Klone LN18 T5as2 und TCtrl

Die Ladekontrolle erfolgte über Co-Hybridisierung mit der GAPDH-as-Sonde.

h: Stunden, Dox - : Ansatz ohne Doxycyclin, Dox + : Ansatz mit Doxycyclin

3.6 Zeitlicher Verlauf des intrazellulären MIF-Protein-Spiegels in der Kurzzeitkinetik

Im Verlauf von 48 h nach Induktion des Tet-On Systems wurde nun der Gehalt des intrazellulären MIF-Proteins in dem humanen Klon LN18 T5as2 untersucht. Da die Produktion von huMIF-as-mRNA wie oben gezeigt bereits nach 8 h anstieg, war anzunehmen, dass sich die Proteinsynthese von humanem MIF bis zum 48 h-Wert durch die Bildung von RNA-Doppelsträngen reduzieren würde. Dies wurde im Folgenden mittels Western Blot überprüft.

Die Zellkultur mit Zellen der Klone LN18 T5as2 und TCtrl und der Versuchsaufbau für die Kurzzeitkinetik verliefen wie unter 3.5.2 beschrieben. Allerdings erfolgte hierbei die Zelllyse zu den vorgegebenen Zeitpunkten mit M-PER zur Proteinpräparation (s. 2.4.5.1). Für den Western Blot (s. Abb. 3.22) wurden dann 14 µg Protein pro Spur aufgetragen und die unter 2.4.5.3 beschriebenen Antikörper eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde eine Ponceau-Färbung (s. 2.4.5.4) angefertigt (Daten nicht gezeigt).

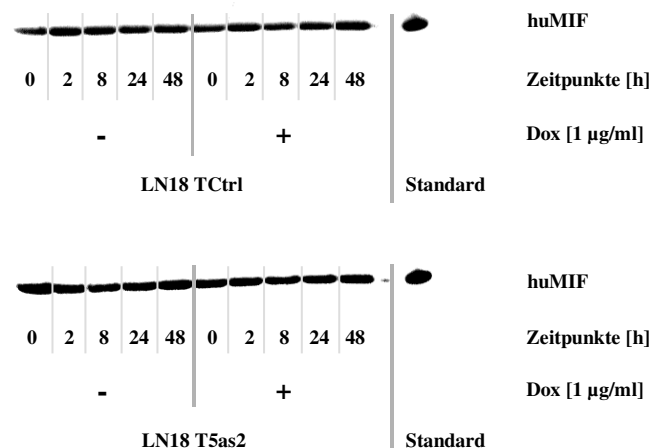


Abb. 3.22 Western Blot zur Kurzzeitkinetik der Klone LN18 T5as2 und TCtrl

Als Standard dienten 5 µl rekombinantes MIF (50 ng/ml).

h: Stunden, Dox - : Ansatz ohne Doxycyclin, Dox + : Ansatz mit Doxycyclin

Es zeigte sich, dass zumindest in den ersten 48 h nach Induktion der huMIF-as-mRNA-Synthese keine Abnahme oder sonstige Veränderung des intrazellulären Gehalts an MIF-Protein auftrat. Dies legte die Vermutung nahe, dass es entweder bis zu diesem Zeitpunkt nicht zu einer Bildung von RNA-Doppelsträngen kam oder dass die Zelle trotz dieser Hybridisierung ihre Proteinsynthese aufrechterhalten konnte. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob es zu einem späteren Zeitpunkt noch zu einer Reduktion der MIF-Protein-Synthese kommt (s. 3.7).

3.7 Veränderung von huMIF-mRNA- und -Proteinspiegel in der Langzeitkinetik

Die Langzeitkinetik mit dem humanen Klon LN18 T5as2 wurde über 21 Tage durchgeführt. Untersucht wurden dabei sowohl mRNA- (sense und antisense) als auch intrazelluläre Proteinspiegel von humanem MIF. Hierbei wurde überprüft, ob es im Verlauf zu einer Blockierung der Proteinbiosynthese durch das Auftreten der huMIF-as-mRNA kommt.

Dabei wurden Zellen in unterschiedlicher Dichte in Falcon Primaria 6-well-plates ausgesät, je nachdem wie lange sie anschließend noch in Kultur verblieben (s. u.). Hiermit wurde eine Konfluenz der Zellen von 90-100 % zum Zeitpunkt der Zelllyse erreicht. Als Zeitpunkte für den Abbruch der Kinetik wurden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 14 und 21 Tage festgelegt.

Zelldichte bei Aussaat:

- 0-2 Tage: 5×10^5 Zellen/ Schale
- 3-5 Tage: 2×10^5 Zellen/ Schale
- 10 Tage: 2×10^4 Zellen/ Schale
- 14 Tage: 1×10^4 Zellen/ Schale
- 21 Tage: 1×10^3 Zellen/ Schale

Für jeden Zeitpunkt wurden 4 Schalen benötigt (jeweils ein Ansatz zur RNA- bzw. Proteingewinnung jeweils mit und ohne Induktion durch Doxycyclin). Ein Parallelansatz zur Kontrolle wurde mit dem humanen Klon LN18 TCtrl

durchgeführt. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde die Kinetik mit einem Mediumwechsel und Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zur Hälfte der wells gestartet. Alle 72 h erfolgte ein Mediumwechsel, alle 24 h wurde erneut Doxycyclin (1 µg/ml) in die entsprechenden Schalen gegeben. Zum Beenden der Kinetik wurde zu den vorgegebenen Zeitpunkten das Kulturmedium abgenommen und die Zellen in dem entsprechenden Puffer lysiert. Die RNA-Präparation erfolgte über eine Säule (s. 2.4.4.1), die Proteinaufbereitung fand mit M-PER (s. 2.4.5.1) statt.

3.7.1 Northern Blot

Für den Northern Blot (s. 2.4.4.2) wurden pro Spur 2,5 µg RNA auf zwei parallelen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Northern-Membranen geblottet. Zur spezifischen Detektion wurde dann für die erste Membran die huMIF-s-Sonde verwendet, für die zweite Membran fand eine Co-Hybridisierung mit der huMIF-as-Sonde und der GAPDH-as-Sonde statt.

In Abb. 3.23 ist dargestellt, dass einen Tag nach Induktion des Tet-On Systems die Synthese von huMIF-as-mRNA ihren Höhepunkt erreicht hatte. Bis zum 21. Tag der Kinetik blieb der Spiegel an as-mRNA dann annähernd konstant. Erwartungsgemäß produzierten die Zellen des Klons LN18 TCtrl keine huMIF-as-mRNA. Betrachtet man den Gehalt an huMIF-s-mRNA, so war über den gesamten Zeitraum der Kinetik weder bei LN18 T5as2 noch bei TCtrl eine Veränderung festzustellen.

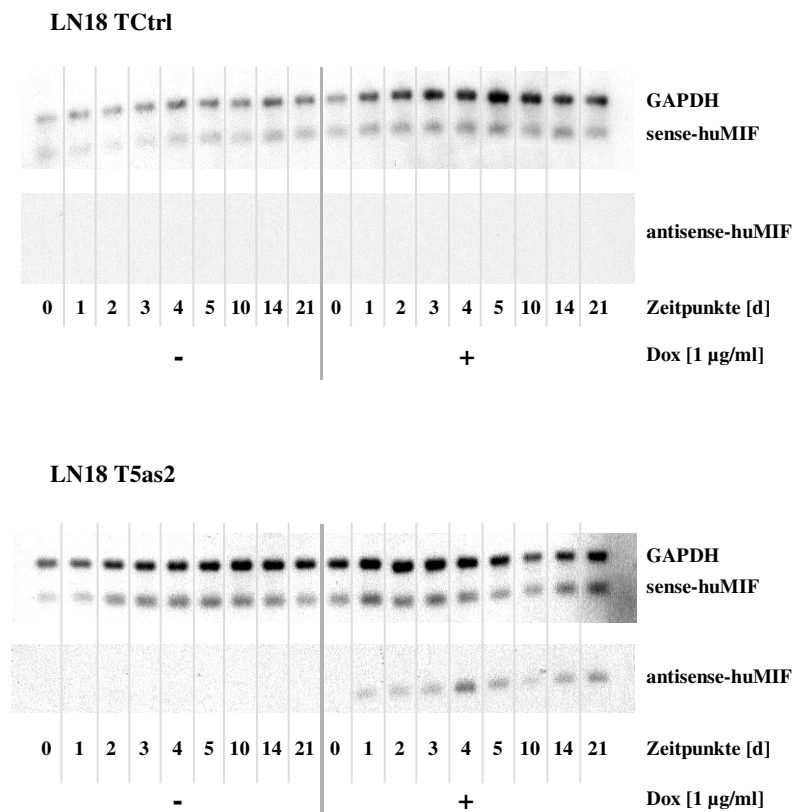


Abb. 3.23 Northern Blot zur Langzeitkinetik der Klone LN18 T5as2 und TCtrl
 Die Ladekontrolle erfolgte über Co-Hybridisierung mit der GAPDH-as-Sonde.
 d: Tage, Dox - : Ansatz ohne Doxycyclin, Dox + : Ansatz mit Doxycyclin

3.7.2 Western Blot

Im Western Blot (s. 2.4.5.3) wurden pro Spur 12 µg Gesamtprotein aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard dienten 5 µl rekombinantes MIF (50 ng/ml). Die Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper erfolgte wie unter 2.4.5.3 beschrieben. Wie Abb. 3.24 zeigt, konnte im Verlauf der Langzeitkinetik mit dem Klon LN18 T5as2 kein Unterschied im huMIF-Proteingehalt zwischen den mit Doxycyclin behandelten und den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Auch zeigten sich keine Unterschiede zwischen LN18 T5as2 und dem Kontrollklon TCtrl. Somit wurde nachgewiesen, dass mit dem huMIF-as-Konstrukt im Tet-On System keine physiologische Auswirkung in den Zellen, z. B. im Sinne einer Reduktion der Proteinsynthese von MIF erreicht werden kann.

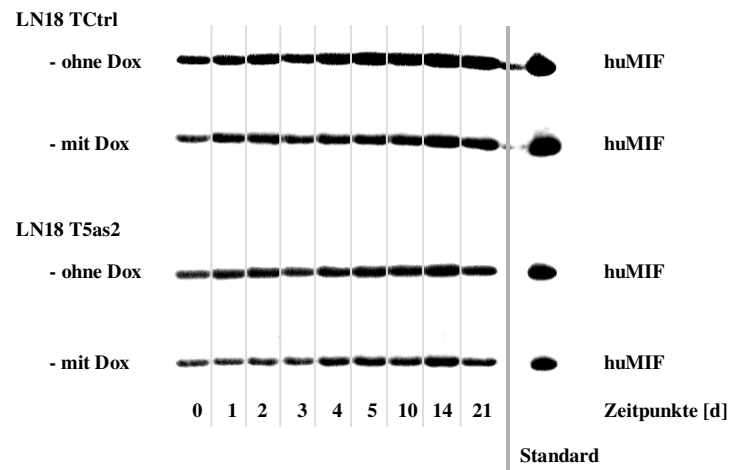


Abb. 3.24 Western Blot zur Langzeitkinetik der Klone LN18 T5as2 und TCtrl

Als Standard dienten 5 µl rekombinantes MIF (50 ng/ml).

d: Tage

4. Diskussion

4.1 Bedeutung von MIF in Glioblastomen

Bei immunhistologischen Untersuchungen von glären Zellen auf ihren Gehalt an MIF fällt auf, dass in nicht pathologisch veränderten Zellen nur eine schwache Expression dieses Proteins nachzuweisen ist (Bacher, M. et al. (1998)). Im Gegensatz dazu findet sich in maligne entarteten Glioblastomzellen im immunhistochemischen Nachweis eine deutlich vermehrte Produktion dieses Faktors. Dazu konform zeigen sich auch in dieser Arbeit hohe Spiegel an MIF-sense-mRNA und –Protein in den verwendeten murinen und humanen Glioblastomzelllinien. Als bevorzugte Lokalisation des MIF-Proteins stellen sich in immunhistochemischen Färbungen die blutgefäßnahen und die nekrotischen Areale des Tumors dar (Bacher, M. et al. (2003), Munaut, C. et al. (2002)). Dieses gesteigerte Vorkommen in den Glioblastomzellen spricht dafür, dass MIF für die Genese und/oder das weitere Wachstum dieses malignen Tumors von entscheidender Bedeutung ist. Diese Funktion als proneoplastischer Faktor für Glioblastome wurde auch schon in vorangegangenen Studien postuliert (Schrader, J., Dissertation (2004)). Als wahrscheinliche Mechanismen, über die MIF eine proliferative Wirkung ausübt, sind die Steigerung der Angiogenese, die direkte Wachstumsförderung und die Antiapoptose zu diskutieren.

Die Blockade der MIF-Funktion in Glioblastomzellen könnte demzufolge ein geeignetes Mittel darstellen, um ein vermindertes Wachstum dieser Tumore zu erreichen.

Eine Technik, die sich schon bei vielen Tumorarten als effizient im Sinne einer Wachstumsreduktion erwiesen hat, ist die Aufhebung der MIF-Funktion durch spezifische MIF-antisense-mRNA bzw. antisense-Oligonukleotide (u.a. Chesney, J. et al. (1999), Meyer-Siegler, K. L. et al. (2004), Ren, Y. et al. (2006), Sasaki, Y. et al. (2002), Shimizu, T. et al. (1999), Takahashi, N. et al. (1998), Yasuda, Y. et al. (2002)).

Auch in murinen und humanen Glioblastomzelllinien konnte durch stabile Transfektion mit einem MIF-antisense-Konstrukt zumindest vorübergehend eine deutliche Reduktion des MIF-Proteinspiegels erreicht werden (Bacher, M. et al.

(2003), Ponath, G., Diplomarbeit (1999), Schrader, J., Dissertation (2004)). Bei längerer Kultivierung der Zellen näherten sich die Proteinspiegel der antisense-Klone jedoch wieder denen der nicht transfizierten Kontrollen an. Es kann somit vermutet werden, dass die Zellen einen wirksamen Kompensationsmechanismus in Gang setzen, um ihren Gehalt an MIF-Protein aufrecht zu erhalten. Dies spricht wiederum dafür, dass MIF für das Überleben und das Wachstum von Glioblastomzellen essentiell zu sein scheint.

Die für diese Arbeit ausgewählte Kombination aus antisense-Technik und induzierbarem Genexpressionssystem bietet nun die Möglichkeit, die Zellen über einen längeren Zeitraum unter natürlichen Bedingungen in Kultur zu halten, um somit möglichen Regulationsmechanismen der Zellen entgegen zu wirken. Die Dauer und Höhe der Expression an MIF-antisense-mRNA ist durch die Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium steuerbar. Dies ermöglicht eine genauere Beobachtung der Zellen in Bezug auf ihre mRNA- und Proteinexpression als es bei den bisher vorhandenen stabil transfizierten MIF-antisense-Klonen der Fall war.

Mit dieser Technik können v. a. bei der LN18-Zelllinie T-as-Klone generiert werden, die etwa 24 h nach Doxycyclingabe große Mengen an MIF-antisense-mRNA produzieren. Diese antisense-mRNA müsste in der Lage sein, über die Bindung an sense-mRNA und Bildung von RNA-RNA-Hybriden zu einer Translationsblockade der MIF-mRNA in den Zellen zu führen. Dieser Vorgang scheint allerdings in den hier verwendeten Glioblastomzelllinien aus unbekannten Gründen nicht statt zu finden, so dass es nicht zu einer Reduktion des MIF-Proteinspiegels kommt.

Eventuelle Gründe dafür, dass das Tet-On System in den Glioblastomzellen zwar prinzipiell zu einer induzierbaren Expression von MIF-antisense-mRNA führt, diese aber trotzdem keine biologischen Auswirkungen auf die Zellklone hat, sollen unter 4.2.4 näher diskutiert werden.

4.2 Problematik der MIF-Blockade durch antisense-Technik im Tet-On System

4.2.1 Abhängigkeit der Genexpression und Induzierbarkeit vom Integrationsort und Zelltyp

Bei dem mit Doxycyclin induzierbaren Tet-On System ist schon in mehreren Studien eine Abhängigkeit der Stärke der Genexpression vom Zelltyp bzw. der verwendeten Zelllinie beschrieben worden (Ackland-Berglund, C. E. und Leib, D. A. (1995), Howe, J. R. et al. (1995), Baron, U. und Bujard, H. (2000)). Ob und in welcher Weise zellspezifische Regulationssysteme dabei eine Rolle spielen ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Auch in dieser Arbeit werden Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien deutlich. So findet sich bei der Zelllinie LN229 schon im Luziferase-Assay trotz einer großen Anzahl untersuchter T-Klone kein Klon, bei dem eine induzierbare Genexpression nachzuweisen ist. Auch bei der RGL3-Zelllinie zeigen nur wenige T-Klone eine gesteigerte Genexpression nach Doxycyclingabe, die zudem auch noch relativ schwach ausfällt. Für die Verwendung des Tet-On Systems am besten geeignet ist in dieser Arbeit die Zelllinie LN18. Hier kann schon im Luziferase-Assay bei vielen T-Klonen eine starke Induktion der Luziferase-Expression nach Doxycyclingabe nachgewiesen werden, was sich auch im weiteren Verlauf bei den T-as-Klonen im Northern Blot bestätigt.

Doch auch innerhalb einer Zelllinie finden sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen T- bzw. T-as-Klonen. Dies wiederum spricht am ehesten für einen Einfluß des Integrationsortes des Regulator- oder des Responseplasmids im zellulären Genom. Das unterschiedliche Ausmaß der Induzierbarkeit wird hier vermutlich durch zelleigene Enhancer oder Silencer verursacht, die dann die Doxycyclin-abhängige Genexpression entweder verstärken oder abschwächen.

4.2.2 Gesteigerte Basalexpression des „gene of interest“

Vor allem bei den T-as-Klonen der RGL3-Zelllinie kann auch im Doxycyclin-freien Medium eine erhöhte Produktion von MIF-antisense-mRNA beobachtet werden, die durch das Regulatorplasmid nicht vollständig inhibiert werden kann. Diese als „gesteigerte Basalexpression“ oder „leaky expression“ bezeichnete unkontrollierte Expression des „gene of interest“ wurde auch in vorangegangenen Studien beschrieben (Baron, U. und Bujard, H. (2000), Corbel, S. Y. und Rossi, F. M. (2002), Saez, E. et al. (1997)).

Als mögliche Ursachen für dieses Phänomen kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum einen wurde von Gossen, M. und Bujard, H. (2002) eine vom rtTA unabhängige Autoaktivität des Tet-responsiven Promotors beschrieben, so dass auch nach Dissoziation des rtTA vom TRE die Transkription des nachfolgenden Gens nicht komplett inhibiert wird.

Auch übt wie unter 4.2.1 beschrieben der klonale Integrationsort Einfluß auf die Genexpression aus. Unter der Kontrolle starker zelleigener Enhancer kann es somit zur gesteigerten Basalexpression des „gene of interest“ kommen (Paulus, W. et al. (2000)).

Des Weiteren ist eine Restaffinität des rtTA für das Tet-responsive Element beschrieben, so dass es auch in Abwesenheit von Doxycyclin zu einer Bindung des Transaktivators an die Promotorregion und dadurch zu einer Aktivierung der Transkription kommt. Diese unerwünschte Bindung könnte jedoch mit einer Weiterentwicklung des rtTA vermieden werden. Dieser von Urlinger, S. und Mitarbeitern (2000) entwickelte und als rtTA²-M2 bezeichnete Transaktivator weist nun keine Restaffinität zur TRE-Region und somit auch keine „leaky expression“ mehr auf.

Als Alternative zu dem rtTA²-M2 kann jedoch auch wie in der vorliegenden Arbeit der „Transcriptional Silencer“ verwendet werden. Mit Hilfe einer Cotransfektion der Plasmide pTet-tTS und pTRE2-as-muMIF bei der zweiten stabilen Transfektion gelingt es, T-as-Klone der RGL3-Linie zu generieren, die das tTS-Protein exprimieren. Dieses Protein ist in der Lage, die unerwünschte Basalexpression zu minimieren, ohne dabei die Induzierbarkeit der Transkription der muMIF-antisense-Sequenz negativ zu beeinflussen (s. Abb. 3.16, RGL3 T13as3).

4.2.3 Abnahme der Induzierbarkeit bei längerer Kultivierung der Zellen

In dieser Arbeit wurde vor allem bei den T-as-Klonen der RGL3-Zelllinie eine stetig abnehmende Induzierbarkeit des Tet-On Systems beobachtet, je länger die Zellen in Kultur gehalten wurden. Ähnliches traf auch für die T-as-Klone der LN18-Zelllinie zu, wenn auch in geringerem Ausmaß. Bei T-as-Klonen, die sofort nach der Selektion und Charakterisierung eingefroren wurden, konnte nach dem Auftauen zunächst wieder eine gleich hohe Induktion der Genexpression hervorgerufen werden wie zuvor. Doch auch hier zeigte sich dann im Verlauf der Kultivierung eine ständige Abnahme der Induzierbarkeit.

Dieses Phänomen der genetischen Veränderung von Zelllinien in Kultur, v. a. auch der verwendeten Glioblastom-Zelllinien, ist schon länger bekannt, seine Ursache jedoch noch nicht abschließend geklärt. Beobachtet werden diese Veränderungen, zu denen auch der Verlust von stabil transfizierten Eigenschaften gehört, vor allem bei dicht gewachsenen Kulturen, die nicht unter ständiger Antibiotikaselektion stehen.

Im Tet-On System wird versucht, dieses Phänomen damit zu erklären, dass der virale Promotor durch zelleigene Mechanismen (z. B. Methylierung) in seiner Funktion eingeschränkt oder ganz abgeschaltet wird (Produktbeschreibung der Firma Clontech).

Ein weiterer Erklärungsansatz geht von der Interferenz mit anderen Antibiotika im Kulturmedium aus (Rennel, E. und Gerwins, P. (2002)). Dies spielt für die vorliegende Arbeit jedoch eher eine untergeordnete Rolle, da während der gesamten Dauer der Kultivierung die gleiche Charge des FCS und die gleichen Antibiotika verwendet wurden. Somit würde eine Interferenz mit anderen Antibiotika nur eine von Beginn an geringe oder fehlende Induzierbarkeit erklären, nicht aber deren allmähliche Verschlechterung.

4.2.4 Mögliche Mechanismen der zellulären Gegenregulation zur Aufrechterhaltung eines konstanten MIF-Proteinspiegels

Schon in vorangegangenen Studien mit stabil transfizierten MIF-antisense-Klonen aus Glioblastom- bzw. anderen Tumor-Zelllinien konnte beobachtet werden, dass die

MIF-Proteinspiegel nach einer anfänglichen Reduktion wieder auf Kontrollniveau oder sogar darüber hinaus anstiegen (Ponath, G., Diplomarbeit (1999), Takahashi, N. et al. (1998)). Dabei wurden weiterhin hohe Spiegel an MIF-antisense-mRNA detektiert, die dann allerdings nicht mehr zu einer ausreichenden Translationsblockade führten. Das Bestreben der Zellen, ihren regulären MIF-Spiegel aufrechtzuerhalten, ist dabei als Hinweis auf die essentielle Rolle von MIF bei der Proliferation von Tumorzellen zu werten. In den beiden zitierten Arbeiten setzte diese zelluläre Gegenregulation allerdings erst nach einigen Wochen ein. Die Ursachen für die Abnahme der Translationsblockade in den Zellen konnten dabei zumindest zum Teil geklärt werden.

So konnten in der Arbeit von Takahashi, N. und Mitarbeitern (1998) durch stabile Transfektion einer Kolonkarzinom-Zelllinie mit einem MIF-antisense-Plasmid Zellklone generiert werden, die ein reduziertes Tumorstadium aufwiesen. Allerdings zeigten sich nach 4-6 Wochen wieder steigende Proliferationsraten, die mit einer deutlichen Erhöhung der MIF-sense-mRNA einhergingen. Mit dieser vermehrten sense-mRNA-Produktion konnten die Zellen die Translationsblockade durch die antisense-mRNA überwinden und ihren Proteinspiegel aufrecht erhalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Erhöhung der sense-mRNA im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Auch traten die zellulären Kompensationsmechanismen nicht erst nach einigen Wochen, sondern anscheinend sofort in Kraft, so dass es trotz hohem MIF-antisense-Spiegel, wie er vor allem bei LN18 T5as2 nachzuweisen war, gar nicht erst zu einer Proteinreduktion kam.

Betrachtet man andere Studien, in denen eine Kombination aus as-Technik und Tet-On System eingesetzt wurde, findet sich meist 48-72 h nach Doxycyclingabe eine deutliche Reduktion des beobachteten Proteins (Dandekar, D. S. und Lokeshwar, B. L. (2004), Thomas, M. K. et al. (2001)). Allerdings beschreiben auch Thomas, M. K. und Mitarbeiter (2001) bei einer β -Zelllinie eine zelluläre Gegenregulation nach 92 h, die zu einer Steigerung des Proteinlevels auf Ausgangsniveau führte. Als mögliche Ursache zeigte sich auch hier eine vermehrte sense-mRNA-Produktion, die durch spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt wurde.

Dieser Mechanismus der Steigerung der mRNA-Syntheserate durch spezifische Transkriptionsfaktoren oder durch Aktivierung zusätzlicher Enhancerregionen ist für diese Arbeit jedoch als eher unwahrscheinlich anzusehen, da es zwischen den T-as-

Klonen und den TCtrl-Klonen keinen Unterschied in den sense-mRNA-Spiegeln gibt.

Allerdings sind auch noch andere Kompensationsmechanismen denkbar.

Zum einen wäre eine Steigerung der Proteinsyntheserate vorstellbar, so dass pro vorhandener MIF-sense-mRNA mehr Protein je Zeiteinheit translatiert wird. Ein ähnlicher Effekt würde auch durch die Stabilisierung der vorhandenen sense-mRNA erreicht werden. Auch eine Erhöhung der Proteinstabilität könnte zu gleichbleibend hohen Proteinspiegeln führen, da das Protein dann nicht mehr so schnell abgebaut würde. Diese Erklärungsmöglichkeiten stehen nicht im Widerspruch zu den gleichbleibend hohen sense-mRNA-Spiegeln. Allerdings wäre es relativ unwahrscheinlich, dass diese Regulationsmechanismen sofort nach Induktion des Tet-On Systems einsetzen würden. Als auslösender Reiz wäre dann eher eine vorübergehende Reduktion des Proteinspiegels zu erwarten, die in dieser Arbeit nicht nachzuweisen ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es aus unbekannten Gründen nicht zu einer Bildung von RNA-RNA-Hybriden kommt, so dass die Translation des MIF-Proteins unbeeinflusst stattfinden kann. Dies wäre mit dem normal hohen sense-mRNA-Spiegel vereinbar. Zudem würde dieser Ansatz auch erklären, warum nicht wenigstens vorübergehend eine Reduktion des Proteinspiegels nachzuweisen war. Dies scheint somit die wahrscheinlichste Erklärung für den gleichbleibend hohen MIF-Proteinspiegel trotz massiver MIF-antisense-mRNA-Synthese in dieser Arbeit zu sein.

Welche auslösenden Reize und welche regulatorischen Mechanismen jedoch genau eine Rolle spielen, um den intrazellulären MIF-Spiegel aufrecht zu erhalten, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.3 Bedeutung für zukünftige Therapieoptionen bei Glioblastomen

Das Glioblastoma multiforme ist der beim Menschen am häufigsten auftretende primäre Gehirntumor. Er ist gekennzeichnet durch eine hohe Malignität und eine mittlere Überlebenszeit von etwa neun Monaten nach Diagnosestellung. Bislang konnte keine wirksame Therapie etabliert werden, so dass die Erkrankung zur Zeit

noch als unheilbar gilt. Umso größer ist das Interesse an möglichen neuen Therapieformen.

Wie zuvor beschrieben scheint das MIF-Protein auf Glioblastomzellen einen proliferativen Effekt auszuüben (Schrader, J., Dissertation (2004)), so dass die Blockade der MIF-Funktion ein neuer Ansatzpunkt zur Tumorthherapie sein könnte.

Für in vitro-, aber auch später für in vivo-Versuche stellt die Kombination aus Tet-On System und MIF-antisense-Technik theoretisch ein geeignetes Mittel dar, um diese MIF-Blockade für therapeutische Zwecke umzusetzen.

Zum einen könnte dieses System spezifisch gegen MIF eingesetzt werden, so dass Nebenwirkungen, wie sie bei anderen antiproliferativen Mitteln oft auftreten, minimiert werden könnten. Dies wäre vor allem dann der Fall, wenn es gelänge, einen geeigneten Vektor zu finden, der das MIF-antisense-Konstrukt spezifisch nur in die malignen Glioblastomzellen transferiert. Ob und wenn ja, wann ein solcher Vektor jedoch hergestellt werden kann, ist zur Zeit noch fraglich.

Ein weiterer Vorteil des Tet-On Systems im therapeutischen Einsatz wäre allerdings, dass der Zeitpunkt der MIF-antisense-Expression frei wählbar ist. Über die Höhe der Doxycyclindosis lässt sich zudem zumindest in einem bestimmten Rahmen auch die Menge an antisense-mRNA regulieren. Dies kann in dieser Arbeit an Hand des Doxycyclin-Assays gezeigt werden, in dem bei Doxycyclindosen unter 1 µg/ml eine Abstufung der Genexpression erkennbar ist (s. Abb. 3.19). Auch dadurch könnten Nebenwirkungen bei der Therapie eventuell abgeschwächt werden.

Allerdings wird an Hand der Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass die Nachteile und Probleme einer solchen Gentherapie häufig unkalkulierbar sind und gegenüber den Vorteilen überwiegen können.

Hier sind an erster Stelle die oben diskutierten technischen Probleme zu nennen. So kommt es trotz eines funktionstüchtigen Tet-On Systems nicht zu einer Reduktion des MIF-Spiegels und somit natürlich auch nicht zu einem wie auch immer gearteten Einfluß auf die Proliferation. Zudem könnte der Nutzen nicht dauerhaft sicher gestellt werden, da auch in vitro nach einer längeren Zeit in Kultur eine Abschwächung der Induzierbarkeit beobachtet wird. Auch ließe sich der Integrationsort des antisense-Konstrukts kaum vorher bestimmen, so dass es auch aus diesem Grund zu einer fehlenden oder zu schwachen Genexpression kommen kann. Als weiteres Problem wäre die unregulierte Basalexpression zu nennen, obwohl diese eventuell mit der neuen Form des Transaktivators (rtTA²-M2) oder dem

„transcriptional silencer“ unter Kontrolle zu bringen ist. Schwierig wäre vor allem auch die Auswahl und Konstruktion eines geeigneten Vektors. Hier eine tumorspezifischen Variante zu entwickeln, würde sicherlich einen großen Schritt in der gentechnologischen Forschung bedeuten.

Neben diesen technischen Problemen sollten auch die biologischen Folgen für den Organismus nicht außer acht gelassen werden. So sind zumindest auch Auswirkungen der MIF-Blockade auf das Immunsystem zu erwarten, in dem das MIF-Protein eine starke proinflammatorische Wirkung zeigt. Auch sind bis jetzt nicht alle Funktionen von MIF vollständig verstanden, so dass es auch zu anderen bislang nicht vorhersehbaren Effekten kommen kann. Hier gilt es dann, Nutzen und Risiko sinnvoll abzuwägen.

Auch sind bis jetzt die Möglichkeiten der Zellen zur Gegenregulation einer solchen antisense-Blockade noch zu wenig verstanden, so dass selbst bei anfänglichem Therapieerfolg dieser nicht auf Dauer sicher zu stellen ist.

Da in den hier verwendeten Glioblastom-Zelllinien der gentechnologische Ansatz mit dem Tet-On System nicht zum Erfolg im Sinne einer MIF-Reduktion führt, lohnt es sich in jedem Fall über weitere Möglichkeiten der MIF-Blockade nachzudenken. Hier kommt unter anderem der Einsatz von anti-MIF-Antikörpern oder chemischen Inhibitoren in Betracht, wie er auch schon in einigen Studien durchgeführt wurde. Auch die spezifische Rezeptorblockade könnte in der Zukunft eine Rolle spielen, so dass sicherlich noch einige Optionen für neue Therapieformen beim Glioblastoma multiforme offen bleiben.

5. Zusammenfassung

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) wird im immunhistochemischen Nachweis in Glioblastomzellen deutlich vermehrt exprimiert. Wie in anderen Tumorarten wird dem MIF auch bei diesem hochmalignen Gehirntumor eine Rolle als proneoplastischer Faktor zugeschrieben. Dabei ist der genaue Mechanismus dieser Wachstumsförderung jedoch noch unbekannt.

Um die Funktionsweise von MIF in Glioblastomzellen besser untersuchen zu können, wird in dieser Arbeit ein mit Tetracyclin induzierbares Genexpressionssystem (Tet-On System) in die Glioblastomzelllinien RGL3, LN18 und LN229 integriert. Mit diesem System soll durch die kontrollierte Expression eines MIF-antisense-Konstrukts die zelleigene MIF-Produktion über eine Translationsblockade abgeschaltet werden.

Dazu werden sowohl die murine Zelllinie RGL3 als auch die humanen Zelllinien LN18 und LN229 doppelt-stabil transfiziert. In einem ersten Schritt wird dabei das Regulatorplasmid pTet-On in das zelleigene Genom eingebaut. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Transfektion des Responseplasmids pTRE2 mit dem integrierten MIF-antisense-Strang.

Der Nachweis der Induzierbarkeit des Genexpressionssystems erfolgt zunächst im Luziferase-Assay nach der ersten stabilen Transfektion. Hier zeigen vor allem die T-Klone der Linien RGL3 und LN18 eine deutliche Steigerung der Expression nach Gabe von Doxycyclin. Allerdings weisen die RGL3 T-Klone eine vermehrte Basalexpression auch ohne Gabe von Doxycyclin auf. Aus diesem Grund wird in diesen Klonen zusätzlich ein „transcriptional silencer“ eingesetzt.

Nach der zweiten stabilen Transfektion wird die Expression von MIF-antisense-mRNA mit Hilfe eines Northern Blot überprüft. Hier ist vor allem beim Klon T5as2 der LN18-Zelllinie eine sehr gute Induzierbarkeit des Genexpressionssystems zu erkennen. Eine unkontrollierte Basalexpression findet nicht statt. Auch T-as-Klone der RGL3-Linie stellen zunächst große Mengen an MIF-antisense-mRNA her. Diese Induzierbarkeit wird jedoch im Verlauf der längeren Kultivierung der Zellen immer schwächer, so dass vornehmlich der Klon LN18 T5as2 eingesetzt wird.

Eine maximale Induzierbarkeit der MIF-antisense-Synthese lässt sich mit 1 µg Doxycyclin pro ml Kulturmedium erreichen. Eine weitere Steigerung der Dosis bringt dann keine Vorteile mehr.

In Kinetiken können maximale Spiegel an MIF-antisense-mRNA etwa 24 h nach Doxycyclin-Gabe nachgewiesen werden. Anschließend bleiben diese Spiegel konstant, wenn alle 24 h erneut Doxycyclin zugegeben wird. Der Gehalt an MIF-sense-mRNA in den Zellen zeigt dabei keine Veränderungen im Verlauf der Kinetik. Auch die im Western Blot dargestellten Spiegel des MIF-Proteins bleiben über 21 Tage unter Doxycyclin-Gabe konstant. Somit kommt es trotz nachweisbarer starker Produktion an MIF-antisense-mRNA vermutlich nicht zu einer Translationsblockade für das MIF-Protein.

Obwohl das induzierbare Genexpressionssystem in Kombination mit einem MIF-antisense-Konstrukt also erfolgreich in den Glioblastom-Zelllinien etabliert werden kann, ist es nicht dazu geeignet, die endogene MIF-Protein-Expression zu unterdrücken. Somit können auch weitere funktionelle Tests, für die ein minimierter Gehalt an MIF-Protein notwendig ist, nicht mit den entstandenen T-as-Klonen durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R., Metz, C. N., 2001, Regulation of the ctl response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 166(2), 747-753

Ackland-Berglund, C. E., Leib, D. A., 1995, Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18, 196-200

Al-Abed, Y., Dabideen, D., Aljabari, B., Valster, A., Messmer, D., Ochani, M., Tanovic, M., Ochani, K., Bacher, M., Nicoletti, F., Metz, C., Pavlov, V. A., Miller, E. J., Tracey, K. J., 2005, ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem* 280(44), 36541-36544

Amin, M. A., Volpert, O. V., Woods, J. M., Kumar, P., Harlow, L. A., Koch, A.E., 2003, Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circulation Research* 93, 321-329

Arndt, U., Wennemuth, G., Barth, P., Nain, M., Al-Abed, Y., Meinhardt, A., Gemsa, D., Bacher, M., 2002, Release of macrophage migration inhibitory factor and cxcl8/interleukin-8 from lung epithelial cells rendered necrotic by influenza a virus. *J Virol* 76(18), 9298-9306

Bacher, M., Eickmann, M., Schrader, J., Gemsa, D., Heiske, A., 2002a, Human cytomegalovirus-mediated induction of mif in fibroblasts. *Virology* 299(1), 32-37

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Dhabar, F., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., Bucala, R., 1998, MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med* 4, 217-230

Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., Bucala, R., 1997, Migration

inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 150, 235-246

Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gerns, D., Donnelly, T., Bucala, R., 1996, An essential regulatory role for MIF in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7849-7854

Bacher, M., Schrader, J., Thompson, N., Kuschela, K., Gerns, D., Waeber, G., Schlegel, J., 2003, Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor gene and protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 162(1), 11-17

Bacher, M., Weihe, E., Dietzschold, B., Meinhardt, A., Vedder, H., Gerns, D., Bette, M., 2002b, Borna disease virus-induced accumulation of macrophage migration inhibitory factor in rat brain astrocytes is associated with inhibition of macrophage infiltration. *Glia* 37(4), 291-306

Baron, U., Bujard, H., 2000, Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* 327, 401-421

Baugh, J. A., Chitnis, S., Donnelly, S. C., Monteiro, J., Lin, X., Plant, B. J., Wolfe, F., Gregersen, P. K., Bucala, R., 2002, A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (mif) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immunology* 3(3), 170-176

Baumann, R., Casaulta, C., Simon, D., Conus, S., Yousefi, S., Simon, H. U., 2003, Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB Journal* 17(15), 2221-2230

Becker, H., Maaser, C., Mickholz, E., Dyong, A., Domschke, W., Gaubitz, M., 2006, Relationship between serum levels of macrophage migration inhibitory factor and the

activity of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. Clin Rheumatol 2006 Jan 4; 1-5

Bendrat, K., AL-Abed, Y., Callaway, D. J., Peng, T., Calandra, T., Metz, C. N., Bucala, R., 1997, Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. Biochemistry 36, 15356-15362

Bernhagen, J., Bacher, M., Calandra, T., Metz, C. N., Doty, S. B., Donnelly, T., Bucala, R., 1996, An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. J Exp Med 183, 277-282

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A., Bucala, R., 1993, MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. Nature 365, 756-759

Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A., Bucala, R., 1994, Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). Biochemistry 33, 14144-14155

Bin, Q., Johnson, B. D., Schauer, D. W., Casper, J. T., Orentas, R. J., 2002, Production of macrophage migration inhibitory factor by human and murine neuroblastoma. Tumour Biology 23(3), 123-129

Bloom, B. R., Bennet, B., 1966, Mechanisms for reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science (Wash. DC) 153, 80

Bodkin, D. K., Knudson, D. L., 1985, Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA-RNA blot hybridization. J Virol Methods 10, 45-52

Bowtell, D., 1998, Soft Agar Assay for Colony Formation #1. <http://www.pmci.unimelb.edu.au/cellbiol/cb20>

Peter MacCallum Cancer Institute (PMCI): Research Division, Melbourne

Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., David, J. R., 1999, Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189, 341-346

Budarf, M., McDonald, T., Sellinger, B., Kozak, C., Graham, C., Wistow, G., 1997, Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (mif) to chromosome 22q11.2. *Genomics* 39(2), 235-236

Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R., 1995, Mif is a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 377, 68-71

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Bucala, R., 1994, The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179, 1895-1902

Calandra, T., Bucala, R., 1997, Macrophage migration inhibitory factor (mif): A glucocorticoid counter-regulator within the immune-system. *Critical Reviews Immunology* 17(1), 77-88

Calandra, T., Echtenacher, B., Le Roy, D., Pugin, J., Metz, C. N., Hültner, L., Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., Glauser, M. P., 2000, Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature Medicine* 6(2), 164-170

Calandra, T., Spiegel, L. A., Metz, C. N., Bucala, R., 1998, Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(19), 11383-11388

Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., Bucala, R., 1999, An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 5, 181-191

Church, G. M., Gilbert, W., 1984, Genomic Sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1991-1995

Corbel, S. Y., Rossi, F. M., 2002, Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes. *Curr Opin Biotechnol* 13, 448-452

Cunha, B. A., Sibley, C. M., Ristuccia, A. M., 1982, Doxycycline. *Ther Drug Monit* 4(2), 115-135

Cvetkovic, I., Al-Abed, Y., Miljkovic, D., Maksimovic-Ivanic, D., Roth, J., Bacher, M., Lan, H. Y., Nicoletti, F., Stosic-Grujicic, S., 2005, Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology* 46(7), 2942-2951

Dandekar, D. S., Lokeshwar, B. L., 2004, Inhibition of Cyclooxygenase (COX)-2 Expression by Tet-Inducible COX-2 Antisense cDNA in Hormone-Refractory Prostate Cancer Significantly Slows Tumor Growth and Improves Efficacy of Chemotherapeutic Drugs. *Clin Canc Res* 10, 8037-8047

Daun, J. M., Cannon, J. G., 2000, Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. *Am J Physiol* 279, 1043-1049

David, J., 1966, Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 56, 72

Diserens, A. C., de Tribolet, N., Martin-Achard, A., Gaide, A. C., Schnegg, J. F., Carrel, S., 1981, Characterisation of an established human malignant glioma cell line: Ln-18. *Acta Neuropathologica (Berlin)* 53(1), 21-28

Donn, R., Alourfi, Z., Zeggini, E., Lamb, R., Jury, F., Lunt, M., Meazza, C., De Benedetti, F., Thomson, W., Ray, D.; British Paediatric Rheumatology Study Group,

2004, A functional promotor haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatica* 50(5), 1604-1610

Donn, R. P., Plant, D., Jury, F., Richards, H. L., Worthington, J., Ray, D. W., Griffiths, C. E., 2004, Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 123(3), 484-487

Dubitsky, A., Brown, J., Brandwein, H., 1992, Chemoluminescent detection of DNA on nylon membranes. *Biotechniques* 13, 392-400

Fan, J., Chen, Y., Chan, H. M., Tam, P. K., Ren, Y., 2005, Removing intensity effects and identifying significant genes for Affymetrix arrays in macrophage migration inhibitory factor-suppressed neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49), 17751-17756

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M., 1987, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7413-7417

Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C. N., Forsthuber, T. G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Muller, W., Bucala, R., 2003, The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(6), 9354-9359

Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., Bujard, H., 1999, A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1, 4-12

Fukuzawa, J., Nishihira, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Fujino, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K., 2002, Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 277(28), 24889-24895

Gareis, M., Harrer, P., Bertling, W. M., 1991, Homologous recombination of exogenous DNA fragments with genomic DNA in somatic cells of mice. *Cell Mol Biol* 37, 191-203

George, M., Vaughan, J. H., 1962, In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc Soc Exp Biol & Med* 111, 514-521

Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B., Minsky, A., 1993, Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 32, 7143-7151

Goldberg, D. A., 1980, Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Sci USA* 77, 5794-5798

Gossen, M., Bonin, A., Bujard, H., 1993, Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem Sci* 18, 471-475

Gossen, M., Bonin, A. L., Freundlieb, S., Bujard, H., 1994, Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* 5, 516-520

Gossen, M., Bujard, H., 1992, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-51

Gossen, M., Bujard, H., 2002, Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36, 153-173

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H., 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769

Hermanowski-Vosatka, A., Mundt, S. S., Ayala, J. M., Goyal, S., Hanlon, W. A., Czerwinski, R. M., Wright, S. D., Whitman, C. P., 1999, Enzymatically inactive

macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry* 38, 12841-12849

Hillen, W., Berens, C., 1994, Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annual Rev Microbiol* 48, 345-369

Hira, E., Ono, T., Dhar, D. K., El-Assal, O. N., Hishikawa, Y., Yamanoi, A., Nagasue, N., 2005, Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103(3), 588-598

Holtke, H. J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K., Kessler, C., 1990, Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids: II. Optimization of the digoxigenin system. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371, 929-938

Holtke, H. J., Sagner, G., Kessler, C., Schmitz, G., 1992, Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. *Biotechniques* 12, 104-113

Honma, N., Koseki, H., Akasaka, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Serizawa, I., Akahori, H., Osawa, M., Mikayama, T., 2000, Deficiency of the macrophage migration inhibitory factor gene has no significant effect on endotoxaemia. *Immunology* 100, 84-90

Howe, J. R., Skryabin, B. V., Belcher, S. M., Zerillo, C. A., Schmauss, C., 1995, The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J Biol Chem* 270, 14168-14174

Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J., Beach, D. H., 1999, A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190(10), 1375-1382

Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A. C., Van Meir, E. G., 1999, Frequent co-alterations of tp53, p16/cdkn2a, p14arf, pten tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathology* 9, 469-479

Ichiyama, H., Onodera, S., Nishihira, J., Ishibashi, T., Nakayama, T., Minami, A., Yasuda, K., Tohyama, H., 2004, Inhibition of joint inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Cytokine* 26(5), 187-194

Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C. N., Rollinghoff, M., Bucala, R., Gessner, A., 1998, Migration inhibitory factor induces killing of leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF α . *J Immunol* 161(5), 2383-2390

Kamimura, A., Kamachi, M., Nishihira, J., Ogura, S., Isobe, H., Dosaka-Akita, H., Ogata, A., Shindoh, M., Ohbuchi, T., Kawakami, Y., 2000, Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 89(2), 334-341

Kessler, C., 1990, The digoxigenin system: principle and applications of the novel nonradioactive DNA labeling and detection system. *Bio Technology Int* 1990, 183-194

Kitaichi, N., Shimizu, T., Honda, A., Abe, R., Ohgami, K., Shiratori, K., Shimizu, H., Ohno, S., 2005, Increase in macrophage migration inhibitory factor levels in lacrimal fluid of patients with severe atopic dermatitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005 Dec 6

Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J., 2000a, Intracellular action of the cytokine mif to modulate ap-1 activity and the cell cycle through jab1. *Nature* 408, 211-216

Kleemann, R., Rorsman, H., Rosengren, E., Mischke, R., Mai, N. T., Bernhagen, J., 2000b, Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor: Full immunologic activity of n-terminally truncated mutants. *Eur J Biochem* 267(24), 7183-7193

Kobayashi, M., Nasuhara, Y., Kamachi, A., Tanino, Y., Betsuyaku, T., Yamaguchi, E., Nishihira, J., Nishimura, M., 2006, Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats. *Eur Respir J* 2006 Feb 2

Koebernick, H., Grode, L., David, J. R., Rohde, W., Rolph, M. S., Mittrucker, H. W., Kaufmann, S. H., 2002, Macrophage migration inhibitory factor (mif) plays a pivotal role in immunity against salmonella typhimurum. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21), 13681-13686

Kudrin, A., Scott, M., Martin, S., Chung, C. W., Donn, R., McMaster, A., Ellison, S., Ray, D., Ray, K., Binks, M., 2006, Human Macrophage Migration Inhibitory Factor: A proven immunomodulatory cytokine? *J Biol Chem* 281(40), 29641-29651, Epub 2006 Aug

Lan, H. Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., Metz, C. N., Meinhardt, A., Bucala, R., Atkins, R. C., 1997, The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunological induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 185, 1455-1465

Lan, H. Y., Yang, N., Nikolic-Paterson, D. J., Yu, X. Q., Mu, W., Isbel, N. M., Metz, C. N., Bucala, R., Atkins, R. C., 2000, Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 57(2), 499-509

Leech, M., Metz, C. N., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S. R., Bucala, R., Morand, E. F., 1999, Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheumatica* 42(8), 1601-1608

Legendre, H., Decaestecker, C., Nagy, N., Hendlisz, A., Schuring, M. P., Salmon, I., Gabius, H. J., Pector, J. C., Kiss, R., 2003, Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (mif) in human colorectal cancers. *Modern Pathology* 16(5), 491-504

Lehrbach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., Boedtker, 1977, RNA molecular weight determinants by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 97-101

Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A., Bucala, R., 2003, Mif signal transduction initiated by binding to cd74. *J Exp Med* 197(11), 1467-1476

Li, Z., Ren, Y., Wu, Q. C., Lin, S. X., Liang, Y. J., Liang, H. Z., 2004, Macrophage migration inhibitory factor enhances neoplastic cell invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinase 9 and interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chinese Medical Journal* 117(1), 107-114

Liao, H., Bucala, R., Mitchell, R. A., 2003, Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (mif). *J Biol Chem* 278(1), 76-81

Lubetsky, J. B., Dios, A., Han, J., Aljabari, B., Ruzsicska, B., Mitchell, R., Lolis, E., Al-Abed, Y., 2002, The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem* 277(28), 24976-24982

Lue, H., Kapurniotu, A., Fingerle-Rowson, G., Roger, T., Leng, L., Thiele, M., Calandra, T., Bucala, R., Bernhagen, J., 2006, Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal* 18(5), 688-703

Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J., 2002, Macrophage migration inhibitory factor (mif): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infection* 4(4), 449-460

Martin, R., Hoover, C., Grimme, S., Grogan, C., Holtke, H. J., Kessler, C., 1990, A high sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechniques* 9, 762-768

Martiney, J. A., Sherry, B., Metz, C. N., Espinoza, M., Ferrer, A. S., Calandra, T., Broxmeyer, H. E., Bucala, R., 2000, Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malaria anemia. *Infection Immunity* 68(4), 2259-2267

McDevitt, M. A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V. R., Metz, C. N., Mitchell, R., Keefer, J., David, J., Leng, L., Bucala, R., 2006, A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* 203(5), 1185-1196, Epub 2006 Apr

Meinhardt, A., Bacher, M., McFarlane, J. R., Metz, C. N., Seitz, J., Hedger, M. P., de Kretser, D. M., Bucala, R., 1996, Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 137, 5090-5095

Meyer-Siegler, K. L., Bellino, M. A., Tannenbaum, M., 2002, Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 94(5), 1449-1456

Meyer-Siegler, K., Fattor, R. A., Hudson, P. B., 1998, Expression of macrophage migration inhibitory factor in the human prostate. *Diagn Mol Pathol* 7(1), 44-50

Meyer-Siegler, K. L., Leifheit, E. C., Vera, P. L., 2004, Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer* 4, 34

Mitchell, R., Bacher, M., Bernhagen, J., Pushkarskaya, T., Seldin, M. F., Bucala, R., 1995, Cloning and Characterization of the Gene for Mouse Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *J Immunol* 154, 3863-3870

Mitchell, R. A., Bucala, R., 2000, Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (mif). *Semin Cancer Biol* 10(5), 359-366

Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R., 2002, Macrophage migration inhibitory factor (mif) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1), 345-350

Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T., Bucala, R., 1999, Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF): regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 274 (25), 18100-18106

Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., Lane, S. J., Craft, J., Nishihira, J., Donnelly, S. C., Zhu, Z., Bucala, R., 2005, Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(40), 14410-14415

Muhlegger, K., Batz, H. G., Bohm, S., von der Eltz, H., Holtke, H. J., Kessler, C., 1990, Synthesis and use of new digoxigenin-labeled nucleotides in nonradioactive labeling and detection of nucleic acids. *Nucleosides & Nucleotides* 8, 1161-1163

Mullis K. B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

Munaut, C., Boniver, J., Foidart, J. M., Deprez, M., 2002, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(6), 452-460

- Murakami, H., Akbar, S. M., Matsui, H., Onji, M., 2001, Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *European Journal of Clinical Investigation* 31(4), 337-343
- Nishihira, J., Fujinaga, M., Kuriyama, T., Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Sakai, M., 1998, Molecular cloning of human D-dopachrome tautomerase cDNA: N-terminal proline is essential for enzymatic activation. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 538-544
- Ogawa, H., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Takahashi, N., Oshima, T., Todo, S., 2000, An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* 12(4), 309-314
- Onodera, S., Nishihira, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanaka, S., Minami, A., 2002, Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix-metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. *J Biol Chem* 277(10), 7865-7874
- Onodera, S., Nishihira, J., Koyama, Y., Majima, T., Aoki, Y., Ichiyama, H., Ishibashi, T., Minami, A., 2004, Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1 β . *Arthritis Rheum* 50(5), 1437-1447
- Onodera, S., Suzuki, K., Matsuno, T., Kaneda, K., Takagi, M., Nishihira, J., 1997, Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* 92(2), 131-137
- Paralkar, V. and Wistow, G., 1994, Cloning the Human Gene for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Genomics* 19, 48-51
- Paulus, W., Baur, I., Keyvani, K., Senner, V., 2000, Variability of transcriptional regulation after gene transfer with the retroviral tetracycline system. *J Biotechnol* 81, 159-165

Petrenko, O., Fingerle-Rowson, G., Peng, T., Mitchell, R. A., Metz, C. N., 2003, Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell-growth and reduced susceptibility to ras-mediated transformation. *J Biol Chem* 278(13), 11078-11085

Ponath, G., 1999, Regulation und Expression von Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) in Glioblastoma multiforme, Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg

Ren, Y., Chan, H. M., Fan, J., Xie, Y., Chen, Y. X., Li, W., Jiang, G. P., Liu, Q., Meinhardt, A., Tam, P. K., 2006, Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma. *Oncogene* 2006 Jan 30, Epub

Ren, Y., Chan, H. M., Li, Z., Lin, C., Nicholls, J., Chen, C. F., Lee, P. Y., Lui, V., Bacher, M., Tam, P. K., 2004, Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma. *Oncogene* 23(23), 4146-4154

Ren, Y., Tsui, H. T., Poon, R. T., Ng, I. O., Li, Z., Chen, Y., Jiang, G., Lau, C., Yu, W. C., Bacher, M., Fan, S. T., 2003, Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 107(1), 22-29

Rennel, E., Gerwins, P., 2002, How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem* 309, 79-84

Repp, A. C., Mayhew, E. S., Apte, S., Niederkorn, J. Y., 2000, Human uveal melanoma cells produce macrophage migration inhibitory factor to prevent lysis by nk cells. *J Immunol* 165(2), 710-715

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S. I., 1994, Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14, 1669-1679

Roger, T., David, J., Glauser, M. P., Calandra, T., 2001, Mif regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920-924

Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Bjork, P., Jacobsson, L., Rorsman, H., 1997, The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett* 417, 85-88

Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N., Rorsman, H., 1996, The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes tautomerization reaction. *Mol Med* 2, 143-149

Saez, E., No, D., West, A., Evans, R. M., 1997, Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* 8, 608-616

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467

Sasaki, Y., Kasuya, K., Nishihira, J., Magami, Y., Tsuchida, A., Aoki, T., Koyanagi, Y., 2002, Suppression of tumor growth through introduction of an antisense plasmid of macrophage migration inhibitory factor. *Int J Mol Med* 10(5), 579-583

Satoskar, A. R., Bozza, M., Rodriguez Sosa, M., Lin, G., David, J. R., 2001, Migration inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous leishmania major infection. *Infection Immunity* 69(2), 906-911

Schlegel, J., Piontek, G., Kuhne, C., Bartels, H. J., Kraus, A., Kappler, R., Mennel, H. D., 1999, Molecular genetic characterisation of intracerebrally transplanted brain tumors. *Exp Toxicol Pathol* 51, 41-45

Schrader, J., 2004, Expression und Funktion von Makrophagen Migrations Inhibitions Faktor (MIF) in humanen Glioblastomzelllinien, Dissertation, Philipps-Universität Marburg

Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M., Nishihira, J., 1999, High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 751-758

Seed, B., 1992, Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazoniumsubstituted supports. *Genetic engineering: Principles and methods*. Vol 4, Setlow, J. K., Hollaender, A. (editors). Plenum Publishing New York, page 91

Seibl, R., Holtke, H. J., Ruger, R., Meindl, A., Zachau, H. G., Rasshofer, R., Roggendorf, M., Wolf, H., Arnold, N., Wienberg, J., Kessler, C., 1990, Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids: III. Applications of the digoxigenin system. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371, 939-951

Smith, J. G., Walzem, R. L., German, J. B., 1993, Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochem Biophys Acta* 1154, 327-340

Steinhoff, M., Meinhardt, A., Steinhoff, A., Gemsa, D., Bucala, R., Bacher, M., 1999, Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in psoriatic skin disease. *Br J Dermatol* 141, 1-7

Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., Nishihira, J., 1999, Crystal structure of human d-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry* 38 (11), 3268-3279

- Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E., 1996, Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5191-5196
- Sun, B., Nishihira, J., Yoshiki, T., Kondo, M., Sato, Y., Sasaki, F., Todo, S., 2005, Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 11(3), 1050-1058
- Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., Sakai, M., 1996, Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 3, 259-266
- Swope, M. D., Sun, H. W., Klockow, B., Blake, P., Lolis, E., 1998, Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and S-hexylglutathione. *J Biol Chem* 273, 14877-14884
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Oshima, T., Une, Y., Todo, S., 1998, Involvement of macrophage migration inhibitory factor (mif) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 4, 707-714
- Thomas, M. K., Devon, O. N., Lee, J. H., Peter, A., Schlosser, D. A., Tenser, M. S., Habener, J. F., 2001, Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* 108, 319-329
- Thomas, P. S., 1980, Hybridisation of denatured RNA and small DNA-Fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5201-5205
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C., McKnight, S. L., 1988, Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Devel* 2, 718-729
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., Hillen, W., 2000, Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators:

novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(14), 7963-7968

Vaillancourt, R. E., Weeden, N. F., Garvin, D. F., 1992, Increasing the efficiency and economy of the chemoluminescent detection of DNA. *Biotechniques* 13, 339-340

Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J. A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C. N., Nicod, P., Bucala, R., 1997, Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4782-4787

Waeber, G., Thompson, N., Chautard, T., Steinmann, M., Nicod, P., Pralong, F. P., Calandra, T., Gaillard, R. C., 1998. Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells. *Molecular Endocrinology* 12 (5), 698-705

Wahl, G. M., Berger, S. L., Kimmel, A. R., 1987, Molecular hybridisation of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol.* 152, 399-407

Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Gianotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C., David, J. R., 1989, Molecular cloning of cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 72-77

Wennemuth, G., Aumüller, G., Bacher, M., Meinhardt, A., 2000, Macrophage Migration Inhibitory Factor induced Ca^{2+} response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 62(6), 1632-1639

White, E. S., Flaherty, K. R., Carskadon, S., Brant, A., Iannettoni, M. D., Yee, J., Orringer, M. B., Arenberg, D. A., 2003, Macrophage migration inhibitory factor and cxc chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Canc Res* 9(2), 853-860

- White, E. S., Strom, S. R., Wys, N. L., Arenberg, D. A., 2001, Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol* 166(12), 7549-7555
- Wistow, G. J., Shaughnessy, M. P., Lee, D. C., Hodin, J., Zelenka, P. S., 1993, A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1272-1275
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., Bonventre, J. V., 1994, The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4514-4518
- Yang, N., Nikolic-Paterson, D. J., Ng, Y. Y., Mu, W., Metz, C. N., Bacher, M., Meinhardt, A., Bucala, R., Atkins, R. C., Lan, H. Y., 1998, Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Potential role of MIF in regulating glucocorticoid production. *Mol Med* 4, 412-422
- Yao, K., Shida, S., Selvakumaran, M., Zimmerman, R., Simon, E., Schick, J., Haas, N. B., Balke, M., Ross, H., Johnson, S. W., O'Dwyer, P. J., 2005, Macrophage migration inhibitory factor is a determinant of hypoxia-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 11(20), 7264-7272
- Yarranton, G. T., 1992, Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3, 506-511
- Yasuda, Y., Kasuya, K., Nishihira, J., Sasaki, Y., Tsuchida, A., Aoki, T., Koyanagi, Y., 2002, Induction of cell arrest by transfection of macrophage migration inhibitory factor antisense plasmid. *Int J Mol Med* 10(4), 463-467
- Yin, D. X., Schimke, R. T., 1995, Bcl-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells. *Cancer Res* 55, 4922-4928

Zeng, F. Y., Weiser, W. Y., Kratzin, H., Stahl, B., Karas, M., Gabius, H. J., 1993, The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is macrophage migration inhibitory factor. Arch. of Biochem. and Biophys. 303(1), 74-80

Zschabitz, A., Gabius, H. J., Zeng, F. Y., Kunt, T., Martens, K. D., Koepp, H., Fassbender, H. G., Stofft, E., 1999, Detection of sarcolectin-specific receptors like the cytokine macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid nodules. Histology and Histopathology 14(3), 771-777

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AP	alkalische Phosphatase
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	Centi-
°C	Grad Celcius
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytidintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DIG-UTP	DIG-markiertes Uridintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS / FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
huMIF	humaner MIF
Ig	Immunglobulin
J	Joule

k	Kilo-
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
m	Milli-
M	molar
μ	Mikro-
MCS	Multiple Cloning Site
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent
mRNA	messenger-RNA
muMIF	muriner MIF
n	Nano-
OD	optische Dichte
p	Piko-
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS ^{-/-}	Phosphate Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
P _{CMV}	complete immediate early promotor des CMV
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _{minCMV}	minimal immediate early promotor des CMV
RLE	relative Leuchteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
rtetR	reverse tet Repressor
rtTA	reverse tetracycline-controlled Transactivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

SSC	Standard Saline Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tetO	tet Operator
TetR	Tet Repressor Protein
TRE	Tet Response Element
tTS	tetracycline-controlled Transcriptional Silencer
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
VP 16	Aktivator-domäne des Herpes simplex Virus

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Bacher, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Feuser, Gemsa, Görg, Gotzen, Griss, Grundmann, Happle, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Kienapfel, Klenk, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lennartz, Lippert, Meinhardt, Moll, Müller, Mutters, Niessing, Oertel, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Schüffel, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Vogelmeier, Voigt, Wahl, Weihe, Werner, Westermann, Wolf

Meine akademischen Lehrer an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Lehrkrankenhaus St. Vincenz, Paderborn) waren die Damen und Herren:

Berndt, Fritz, Götte, Kauther, Krings, Markus, Meinerz, Most, Schmidt, Storm

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ganz entscheidend beigetragen haben.

Zunächst ist da mein Doktorvater PD Dr. Michael Bacher zu nennen. Ihm danke ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und seine tatkräftige Unterstützung bei so manchem Problem. Seine Fähigkeit, sich und andere für das Thema MIF zu begeistern, ist auch an mir nicht spurlos vorüber gegangen. Danken möchte ich ihm auch dafür, dass er für mich immer ein offenes Ohr hatte und bereit war, sein Wissen an mich weiter zu geben.

Als nächstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gemsa dafür bedanken, dass er mich als damaliger Leiter des Institutes für Immunologie als Doktorandin angenommen hat. Seine ständige Bereitschaft, offene Fragen mit mir zu diskutieren, und seine konstruktive Kritik haben mich häufig einen großen Schritt weiter gebracht.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für die freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnen möchte ich hier meine medizinischen und humanbiologischen Kommilitonen Gerald, Jörg, Karen, Christoph, Mike und Timm, mit denen die Laborarbeit auch am Wochenende oder nachts immer viel Spaß gemacht hat. Auch bei Rückschlägen während meiner Arbeit konnte ich immer auf sie zählen.

Meinem Vater möchte ich in diesem Rahmen ganz herzlich für die Unterstützung bei meiner gesamten Ausbildung danken, auch dafür, dass er mich meinen Weg hat gehen lassen.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Schwiegereltern, die es mir immer wieder ermöglicht haben, ein paar „kinderfreie“ Stunden am Computer zu verbringen, um diese Arbeit endgültig fertig zu stellen.

Ebenso möchte ich meinen Töchtern Fenja und Maya danken, dass sie mich so viele Stunden entbehrt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann Stephan bedanken. Ohne ihn und seine ständige Ermunterung, doch endlich meine Doktorarbeit zu schreiben, hätte ich sicher heute noch keine Zeile zu Papier gebracht. Er hat mir immer wieder Zeit und Freiräume geschaffen, um mit meiner Arbeit weiter machen zu können. Dafür, vor allem aber auch für die seelische und moralische Unterstützung, gebührt ihm mein herzlichster Dank.

